

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究
Author(s)	岡田, 誠治
Citation	
Issue date	2009-03
Type	Research Paper
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11369">http://hdl.handle.net/2298/11369</a>
Right	

平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策研究事業  
(H19-エイズ一般-003)

# HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡 田 誠 治  
(熊本大学エイズ学研究センター 教授)

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

I.	総括研究報告書	
	HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する 多面的治療戦略開発に関する研究	-----1
	岡田 誠治	
II.	分担研究報告書	
	1) エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き作成	-----5
	味澤 篤	
	2) HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫 に対する多面的治療戦略開発に関する研究	-----7
	ー日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化ー	
	永井 宏和	
	3) 日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と 日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化	-----11
	照井 康仁	
	4) エイズ合併リンパ腫の分子標的治療法開発に関する研究	-----17
	渡邊 俊樹	
	5) エイズ関連リンパ腫に対するスタチンと DHMEQ の併用 療法の検討	-----25
	片野 晴隆	
	6) B 細胞腫瘍化の主因である EBV を標的にした治療法開発	-----31
	駒野 淳	
	7) EB ウイルスによるリンパ腫発症モデルの開発	-----41
	藤原 成悦	
	8) エイズリンパ腫発症モデルと薬剤治療モデルの確立	-----47
	清水 則夫	
	9) エイズ関連悪性リンパ腫発症マウスモデルの確立	-----53
	岡田 誠治	
	(資料) エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き	-----57
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----75

## HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する 多面的治療戦略開発に関する研究

主任研究者 岡田 誠治 熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 教授

**研究要旨** エイズ関連悪性リンパ腫は世界的にも日本国内でも増加している。エイズリンパ腫は、治療困難例が多いこともあり、エイズ患者の長期予後を大きく規定するが、未だに標準的な治療法は確立していない。そこで、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法の確立と新規治療法の開発を目指して研究を行っている。本年度は、「エイズリンパ腫治療の手引き」の策定とエイズリンパ腫治療の日本全国レベルの多施設共同研究のプロトコール作成を行った。また、病態解析に基づいた治療薬のスクリーニングとエイズリンパ腫発症・治療モデルの開発を行った。今後、長期的視野に立ったエイズリンパ腫の多面的治療戦略を展開する。

### 研究分担者：

渡邊 俊樹

（東京大学大学院新領域創成科学研究科教授）

味澤 篤

（東京都立駒込病院 感染症科）

永井 宏和

（国立病院機構名古屋医療センター 部長）

藤原 成悦

（国立成育医療センター研究所 部長）

照井 康仁

（癌研究会癌研有明病院血液腫瘍科 癌化学療法センター臨床部 血液腫瘍科担当部長）

清水 則夫

（東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授）

片野 晴隆

（国立感染症研究所感染病理部 室長）

駒野 淳

（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）

### 研究協力者：

小田原 隆

（東京大学医科学研究所附属病院 講師）

上平 朝子

（国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター 医長）

四本 美保子

（東京医大附属病院臨床検査科 助教）

萩原 将太郎

（国立国際医療センター 血液内科 医長）

### A. 研究目的

HAART 導入後エイズが慢性疾患化した現在、エイズ関連悪性リンパ腫（以下エイズリンパ腫）はエイズ患者の長期予後を規定する最重要因子のひとつとなった。エイズリンパ腫は難治性・再発性であり、有効な標準的治療法は確立していない。従って、エイズリンパ腫の標準的な治療法の確立と治療抵抗性エイズリンパ腫に対する有効な新規治療法の開発は、エイズ対策として厚生労働行政上急務である。本研究では、エイズと悪性リンパ腫治療の最前線に立つ

エイズ治療専門医・血液化学療法専門医と基礎研究者が有機的に提携し、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の治療プログラムの確立と新規治療薬の開発を軸に多面的治療戦略を展開する。

## B. 研究方法

研究は、相互に関連のある3つの大きな柱を軸に展開する。

### 柱1 日本人悪性リンパ腫治療最適化プログラムと新規サルベージ療法開発に関する研究

エイズリンパ腫は予後不良であり、海外で開発されたエイズリンパ腫治療プロトコールは、必ずしも日本人に適したものではない。そこで、日本におけるエイズリンパ腫の発生状況と治療状況を把握し、専門家により日本人に最適化された標準的治療法の「治療の手引き」を策定し、その普及を図る。合わせて標準的プロトコールを作成して、多施設共同治験を行う。また、病態解析に基づいた新規分子標的療法とサルベージ療法の考案と研究段階にある治療法の有効性を検討し、日本人エイズリンパ腫に有効な治療最適化プログラムを構築する。

### 柱2 エイズリンパ腫の分子病態解析

日本人エイズリンパ腫の臨床病理学および分子生物学的解析を通して、リンパ腫発生の分子メカニズムおよび化学療法耐性細胞出現の分子機構解明を試みる。また、予後因子として様々な遺伝子の関与を解析し、臨床にフィードバックする。マイクロアレイ等による分子病態解析・発症機序解析に基づいたエイズリンパ腫の新たな分子標的療法と発症予防法の開発を目指す。また、研究段階にある治療法(NF- $\kappa$ B阻害薬、JAK・MEK阻害剤、Statin系薬剤、免疫療法等)の有効性を検討し、病態解析に基づいた新規分子標的療法と発症予防法の開発を目指す。

### 柱3 エイズリンパ腫再現マウスモデルの開発と治療法開発への応用

高度免疫不全マウス体内でヒト造血・免疫系を構築する系とリンパ腫細胞が生着する系(ヒト化マウス)を用いて日和見エイズリンパ腫発生を再現する「エイズリンパ腫再現マウスモデル」を樹立し、その分子病態の解析から新たな

治療法の開発及び治療法の標準化に資する。また、リンパ腫モデルマウスを用いた治療薬の評価法を確立する。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料及び動物を用いた研究では、各施設の必要な委員会の承認を得た上で、規則に従い実施する。ヒト臍帯血・末梢血・手術標本を使用した研究では、医師により本研究の趣旨を説明し、同意を得られた方のみ同意書に署名をいただいた上で試料を採取する。試料は匿名処理を行うため個人情報が流出することはなく、同意の撤回を可能にするなど人権擁護上の配慮を行っている。エイズ関連悪性リンパ腫の治療に関する多施設共同治験においては、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守してプロトコールを作成し、各共同臨床研究機関の倫理委員会の承認を得た上で、規則に従い実施する。

## C. 研究結果

### 柱1 日本人悪性リンパ腫治療最適化プログラムと新規サルベージ療法開発に関する研究

平成19年度のエイズ拠点病院369施設、血液研修指定病院502施設(重複209施設)へのアンケート調査での結果、エイズリンパ腫の症例は53施設が経験していたが、ほとんど施設が1-2例の少数例で、そのような施設では治療法の選択に苦慮しており、標準的な治療法の確立と治療指針の策定を強く希望していた。そこで、味澤を中心としたワーキンググループにより「エイズリンパ腫治療の手引き」を作成した。岡田が日本血液学会で「エイズリンパ腫」についての教育講演を行い、日本エイズ学会では「エイズリンパ腫」のシンポジウムにおいて班員が発表を行うなど、研究成果の公開と普及に努めた。両学会で、「治療の手引き」を合計500部配布し、併せて専門家から意見聴取を行った。これらの意見をもとに「エイズリンパ腫の治療の手引き」改訂版を作成し、公開する予定である。

また、日本人エイズリンパ腫の最適化された治療プログラム作成のために全国規模の臨床治験を行うためのワーキンググループを立ち上げ、現在、エイズリンパ腫で最も多いび慢性大細胞性リンパ腫と治療抵抗性リンパ腫のプ

ロトコールを作成中である。平成 21 年度から臨床治験を開始する予定である。

## 柱2 エイズリンパ腫の分子病態解析

エイズリンパ腫と EBV 陽性 LCL 細胞株では、NF- $\kappa$ B が強発現し NF- $\kappa$ B 阻害剤が有効であることが確認された。また、エイズリンパ腫治療において Rituximab は有効であるが、非エイズリンパ腫において CD20 変異により耐性が生じること、CD5 発現例では治療成績が悪いことなどが報告された。保存検体を用いたマイクロアレイ解析を試みたが、検体の保存状態が悪く総合的な解析には適さないことが判明した。そのため、これらの検体を用いた解析方法の工夫と新たな検体収集システムの構築を計画している。

## 柱3 エイズリンパ腫再現マウスモデルの開発と治療法開発への応用

新たな高度免疫不全マウスを用いてヒトの造血・免疫系を構築したマウス（ヒト化マウス）を樹立した。「ヒト化マウス」に EBV を感染させることにより、潜伏感染とリンパ増殖性疾患のモデルが確立した。また、リンパ腫細胞株を移植したマウスに NF- $\kappa$ B 阻害剤などを投与するエイズリンパ腫治療モデルを樹立した。

## D. 考察

エイズ拠点病院・血液研修指定病院へのアンケート調査により、日本においてもエイズリンパ腫症例は増加していること、各施設が治療に苦慮していることが判明した。治療指針を提示して欲しいとの要望が多かったため、エイズリンパ腫に対する「治療の手引き」を作成した。日本人エイズリンパ腫の症例が少ないため、世界の状況を参考に現時点で最良と思われる治療法を示したが、今後症例を蓄積して、日本人に最適化された治療法を継続的に提示していくことが必要である。また、エイズリンパ腫の日本全国規模の多施設共同研究を開始するための体制を整え、エイズリンパ腫で最も多いび慢性大細胞性リンパ腫と治療抵抗性リンパ腫のプロトコールを作成中である。多施設共同研究により治療上の問題点が抽出され、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法

の確立に大きく寄与することが期待できる。また、エイズリンパ腫の病態解析とそれに基づいた新規治療法の開発にはエイズリンパ腫の検体収集が必要であり、多施設共同研究はその母体として機能することも期待される。

エイズリンパ腫発症には EBV の関与が指摘されていることから、EBV によるエイズリンパ腫発症マウスモデルと EBV 陽性 LCL 細胞株を作成し、病態解析とこれらを標的とした治療薬開発を行っている。近年 EBV が関与しないエイズリンパ腫が増加していることから、EBV 陽性例と陰性例の遺伝子プロファイルの比較を行い、エイズリンパ腫の再分類と病態解明に資することが必要である。また、マウスモデルは、エイズリンパ腫研究と治療法開発において非常に有用なツールとなりうる。今後 3 つの柱を中心に、長期的視野に基づいたエイズリンパ腫の多面的治療戦略を展開する

## E. 結論

日本人に最適化されたエイズリンパ腫の治療プログラムの確立と新規治療薬の開発を軸に多面的治療戦略を展開している。本年度は、エイズリンパ腫の「治療の手引き」を策定し、全国レベルの多施設共同研究の実施体制を整えた。また、エイズリンパ腫発症・治療マウスモデルの作成、分子標的療法としての rituximab の有用性と危険性、NF- $\kappa$ B 阻害剤の有用性についての知見を得るなどの研究の進展が認められた。

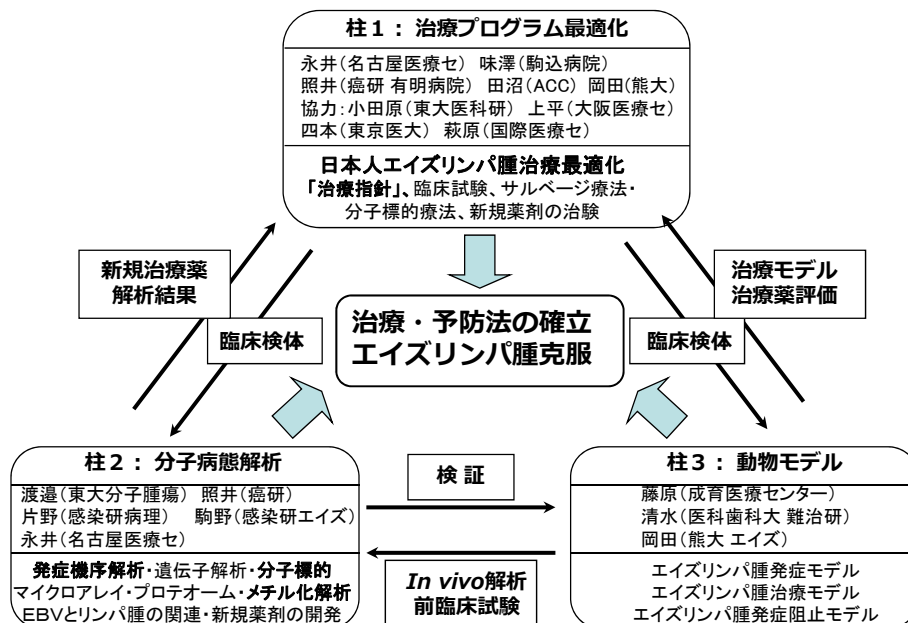
## F. 健康危機情報

該当なし

図1. 日本人エイズ関連悪性リンパ腫の克服

	柱1：最適化治療プログラム [永井、味澤、田沼、照井、岡田] 研究協力：小田原(癌研有明病院)、上平(大阪医療セ)、四本(東京医大)、萩原(国際医療セ)	柱2：分子病態解析 [渡邊、照井、片野、駒野、永井] 研究協力：竹内(癌研有明病院)	柱3：動物モデル [藤原、清水、岡田]
19年度	・日本人エイズリンパ腫の現状と治療成績検討 ・分子標的療法(抗CD20/22)	・がん関連遺伝子のメチル化解析 ・遺伝子多型(CD20、FcyIIIa)解析 ・リンパ腫症例の遺伝子解析 ・臨床検体の収集計画	・EBV持続感染系の確立 ・エイズリンパ腫モデルマウス ・薬物治療モデルの開発
20年度	・日本人エイズリンパ腫の 治療指針の作成 ・日本人エイズリンパ腫の最適化 治療プログラムの臨床試験開始 ・サルベージ療法の提案	・EBVとエイズリンパ腫の関連 ・分子標的療法の機序と 副作用解析 ・リンパ腫症例の遺伝子解析	・EBVによるリンパ腫発症モデル ・エイズリンパ腫モデルを用いた 新規治療法の開発
セミナー開催による研究成果の公開と社会還元			
21年度	・び慢性大細胞性リンパ腫の 全国規模の臨床試験開始 ・サルベージ療法の臨床試験 開始 ・「治療の手引き」の公開	・エイズリンパ腫発症機序の分子 生物学的解析 ・エイズリンパ腫中央診断と検体 収集システムの構築 ・病態解析に基づく新規治療薬 のデザイン	・エイズリンパ腫発症モデルマウス の確立と新規分子標的薬を用いた 治療モデルの開発 ・エイズリンパ腫発症阻止マウス モデルの作成
シンポジウム開催による研究成果の公開と社会還元			
成果： エイズリンパ腫治療法の確立、新規治療薬の開発			
長期的成果： 患者救済と医療費削減			

図2. 研究ネットワーク



## エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き作成

分担研究者 味澤 篤 都立駒込病院感染症科 部長

**研究要旨** Acquired immunodeficiency syndrome（AIDS）に関連した非ホジキン悪性リンパ腫（AIDS-related non-Hodgkin lymphoma、ARNHL）の経験のない血液科医師および human immunodeficiency virus（HIV）担当医師を対象にエイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引きを作成した。ARNHL が非 HIV 感染者における非ホジキン悪性リンパ腫とどのような点で異なり、その治療方針はどうあるべきかを総論的に記載した。

### A. 作成目的

UNAIDS(Joint United nations Programme on HIV/AIDS)の推定では、現在世界で 3,300 万人の HIV-1 感染者がおり、年間 250 万人が新たに感染し、210 万人が死亡している(2007 年末)。一方、本邦における HIV-1 感染者は増加の一途をたどり 2007 年度の HIV-1 感染者とエイズ患者の新規発生件数は 1500 件となっている。近年、多剤併用療法(HAART: Highly active antiretroviral therapy)の普及により HIV-1 感染者の日和見感染の発現頻度は減少し、HIV-1 感染者の予後は劇的に改善しているが、代わって悪性腫瘍の合併増加が問題となっている。

AIDS 非ホジキン悪性リンパ腫（AIDS-related non-Hodgkin lymphoma、ARNHL）は AIDS 指標疾患として位置づけられており、HIV-1 感染者の 5-20%は生涯にエイズリンパ腫を合併するため、その長期予後を規定する最重要因子とされている。永井らは、全国の血液研修施設とエイズ拠点病院へのアンケート調査を行い、回答のあった 349 施設中 143 施設(41%)で ARNHL を経験していると報告した(Int J Hematol 87:442,2008)。また、HIV-1 感染の診断がされおらず ARNHL で発症して血液科を訪れる「いきなりエイズ」の症例もあることから、ARNHL は血液専門医が遭遇する可能性の高い疾患となっている。しかし、ARNHL の施設当たりの症例経験数が少なく、難治性再発性でエイズ特

有の合併症も多く、標準的な治療法が確立していないことから、本邦における ARNHL の標準的治療法の確立は急務である。

### B. 作成方法

手引きは、厚生労働省エイズ対策研究事業「HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究」班のワーキンググループで、ARNHL の経験の少ない血液専門医と HIV-1 感染者担当医を対象に作成した。特に ARNHL 治療時に注意が必要な抗 HIV-1 薬と抗悪性腫瘍薬の併用上の注意や ARNHL の特徴、エイズ特有の合併症に重点をおいて解説した。

第 1 回ワーキンググループ会合（2008 年 4 月 12 日）で、たたき台を作成しワーキンググループで検討することに決定した。2008 年 6 月 18 日に Ver 0.1 を作成しワーキンググループに配布し、意見を求めた。それをもとに 2008 年 9 月 29 日 Ver 0.5 を作成しワーキンググループに配布した。2008 年 10 月 11 日、血液学会での AIDS 関連悪性リンパ腫の教育講演で Ver 0.5 を 200 部配布し意見を求めた。第 2 回ワーキンググループ会合も行った。集まった意見をもとに、Ver 0.9 を作成し、2008 年 11 月 27 日、日本エイズ学会のエイズ関連悪性リンパ腫シンポジウムで Ver 0.9 を 300 部配布し、再度意見を求めた。第 3 回ワーキンググループ会合も



行った。集まった意見をもとに最終版を作成した。

### C. 研究結果

別紙に示すとおり、エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き Ver 1.0 を作成した。

### D. 考察

ARNHL は標準治療法が確立しておらず、明確なガイドラインはない。British HIV Association の「HIV Associated Malignancies」、National Cancer Institute のホームページ「AIDS-Related Lymphoma Treatment」 および National Comprehensive Cancer Network の「Non Hodgkin's Lymphoma 」を参考に治療手引きを作成した。今後の国内外でのエビデンスを基に、修正していく必要がある。したがって今回の手引きは、ARNHL が非 HIV 感染者における非ホジキン悪性リンパ腫とどのような点で異なり、その治療方針はどうあるべきかを総説的に記載した。

### E. 結論

日本国内での ARNHL の診療・治療に有用と考えられる。

### F. 健康危機情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

(国内学会)

- 1) 味澤篤. AIDS関連非ホジキンリンパ腫におけるHAART併用EPOCH 療法、第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、2008 年 11 月 26 日-28 日、大阪

### H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし。

## HAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する 多面的治療戦略開発に関する研究

分担研究者 永井 宏和 国立病院機構名古屋医療センター 部長

**研究要旨** HAART が導入され AIDS defining illness としての日和見感染の頻度は減少してきたが、悪性リンパ腫（以後エイズリンパ腫）は減少傾向がない。エイズリンパ腫の治療法の確立はエイズ全体の診療向上に大きく寄与すると考えられる。本邦におけるエイズリンパ腫の治療は施設間格差が大きく、今後の治療戦略上、多施設共同臨床試験の実施が急務である。エイズリンパ腫は血液内科、感染症科など診療体制が施設により異なることもあり、多施設共同臨床試験を行うには、施設間でのコンセンサスの形成・試験体制の整備・データセンターの設置などが重要な課題となる。平成 20 年度は臨床試験を開始する基盤の構築を行った。これにより、複数の臨床試験プロトコールの開始が可能になった。

### A. 研究目的

HAART が広く導入され、AIDS-defining illness (ADI)としての日和見感染の頻度は劇的に減少してきている状況において、エイズリンパ腫は ADI として最も頻度の高い疾患となってきた。しかし、標準的な初発例に対する治療法、再発例に対する救済療法は確立していない。エイズ特異的な免疫力の低下もあり、通常の化学療法への適応は注意を要すると考えられている。エイズリンパ腫に対する治療法は欧米から多くの報告があるが、標準治療の確立に至っておらず、本邦では症例報告レベルの研究がなされているのみである。平成 19 年度に当研究班で全国のエイズリンパ腫の実態調査を施行した。エイズ拠点病院 369 施設、血液研修指定病院 502 施設（重複 209 施設）を対象としアンケート調査をおこなった（回答率約 60%）。この結果により、エイズリンパ腫に対する治療法の施設間での差が大きいこと、HAART を含む支持療法も統一したものがないことが明らかになった。今後エイズリンパ腫に対する治療法の確立に向けた研究が必要である。本邦初となるエイズリンパ腫の多施設共同臨床試験を開始すべく

平成 20 年度は研究体制の整備、プロトコール作成を行った。

### B. 研究方法

1. 多施設共同臨床試験を高品質に行うためにデータセンターの整備・生物統計家の協力体制を確立する。
2. びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL)はエイズリンパ腫の中で最も頻度が高い疾患群である。今回の多施設共同研究はエイズ関連の DLBCL を対象としプロトコール作成を行う。

#### （倫理面への配慮）

現在、プロトコール作成が進行中である。今後、当臨床試験が実施される場合には各施設での IRB での審査が必要となる。

### C. 研究結果

1. データセンターの整備  
多施設共同臨床試験はプロトコール作成・症例報告書作成・症例登録の一元化・データクリーニング・臨床試験実施時の安全性の検証・データ解析などを高品質で行わなくてはならないため、データセンターを完備しなければ実施不能である。当研究にお

いては、国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センターにデータセンターを設置し、専属のデータマネージャーを選定した。また、生物統計学による論理的検証が必須であるため、生物統計家の協力が得られる体制を整えた。

## 2. 研究体制の整備

エイズリンパ腫は施設により担当診療科が異なることが多い。多くは血液内科または感染症科が担当している。平成 19 年度の調査研究から、単施設でエイズリンパ腫を多く診療している施設が明らかとなった。それらの施設に共同研究を提案し、参加して頂ける事となった。これにより、本邦で発症するエイズリンパ腫の約半数以上、東京・大阪・名古屋の大都市圏の殆どを網羅出来る体制となった。

## 3. 治療プロトコルの作成

治療法：

現在エイズ関連 DLBCL に対する標準的な治療法は確立していない。欧米からは m-BACOD、CHOP 療法、Rituximab 併用 CHOP 療法、EPOCH 療法、Rituximab 併用 EPOCH 療法などの報告がある。本研究では非エイズ aggressive lymphoma の標準療法であり、安全性も確立している CHOP 療法を採用した。Rituximab の併用は奏効率を向上することが明らかになっているが、エイズ症例における安全性は確立していない。本試験では支持療法を高レベルで均一に行うことを条件として Rituximab 併用を行うこととした。

HAART は必ず併用とする。

また試験デザインとしては single arm phase II study とする。

Primary endpoint:

奏効率

Secondary endpoint

完全奏効率、2 年生存率、2 年無増悪生存率、有害事象発生割合

以下の条件を満たす症例を対象とする。

1. DLBCL であることが病理組織学的に証明されている。
2. HIV 陽性である。

3. 腫瘍細胞に CD20 抗原が陽性である。
4. 測定可能病変を有する。
5. 年齢が 20 才以上 69 才以下である。
6. 腫瘍臓器の機能が保たれている。
7. PS(ECOG)が治療開始時 0-2 である。
8. 化学療法の既往がない。
9. 本試験参加について文書による同意が本人から得られている。

研究期間と予定症例数

症例登録期間：3 年間

追跡調査期間：2 年間

総研究期間：5 年

予定症例数：42 症例

症例数算定の統計学的根拠

検出力 90%、 $\alpha$ エラー 0.1 として null proportion を 0.5、alternative proportion を 0.7 とすると 39 症例が必要。事後不適格例を 1 割見込み 42 例と設定した。

## D. 結論

平成 19 年度の調査研究により、エイズリンパ腫の治療が施設間で差が大きいことが判った。このことは、本邦において当疾患の認識が低く、また本邦からのエビデンスが欠如しているためと考えられる。本邦での治療研究によるエビデンスの蓄積が急務である。当研究は本邦初の多施設共同臨床試験としてエイズリンパ腫の治療法開発を目指している。本年度は臨床研究を高い品質で施行するための infrastructure の整備としてデータセンターの設置、研究グループの拡大、治療プロトコルのコンセンサス形成、プロトコル作成を行った。次年度は本臨床試験の登録を開始する予定である。

## E. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, Okada S.

Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan.

Int J Hematol. 87: 442-443, 2008

- 2) Nagai H, Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Hanada S, Kawano F, Sunami K, Inoue N, Sawamura M, Nishiura T, Hotta T, Horibe H.

- Remission induction therapy containing rituximab markedly improved the outcome of untreated mature B cell lymphoma. British J Haematol. 143: 672-680, 2008
- 3) Kubota T, Moritani S, Yoshino T, Nagai H, Terasaki H  
Ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with polyclonal hypergammaglobulinemia. Am J Ophthalmol. 145:1002-1006, 2008
  - 4) Terasawa T, Lau J, Bardet S, Couturier O, Hotta T, Hutchings M, Nihashi T, Nagai H.  
Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Interim Response Assessment of Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Systematic Review. J Clin Oncol. in press, 2009
  - 5) 永井宏和  
ホジキンリンパ腫 がん薬物療法学—基礎・臨床研究のアップデート—  
日本臨床、67: 764-770, 2009
  - 6) 永井宏和  
再発または難治性多発性骨髄腫におけるレナリドマイドの役割  
医薬ジャーナル、44: 113-118, 2008
  - 7) 永井宏和  
濾胞性リンパ腫—悪性リンパ腫 update in 2008  
内科、102: 293-299, 2008
  - 8) 岡田誠治、永井宏和、味沢篤  
エイズ関連リンパ腫の現状と治療戦略  
臨床血液、49: 206-214
  - 9) 永井宏和  
ホジキンリンパ腫  
Cancer Treatment Navigator (中川和彦編)、メディカルビュー社、pp206-207, 2008
2. 学会発表  
(国際学会)
  - 1) Nagai H, Hagiwara K, Hamaguchi M, Hotta T.  
p57KIP2 gene methylation is useful to detect minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma. 10<sup>th</sup> International Congress on Malignant lymphoma. (Lugano Switzerland) June 4-7, 2008.
  - 2) Nagai H, Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Kawano F, Hanada S, Sunami K, Ikeda H, Sawamura M, Nishiura T, Hotta T, Horibe K.  
Remission induction therapy containing rituximab improved the outcome of untreated DLBCL especially at poor risk of R-IPI- a retrospective analysis. The 32<sup>th</sup> World Congress of the International Society of Hematology, (Bangkok, Thailand) October 19-23, 2008  
(国内学会)
  - 1) 永井宏和、岩崎奈美、小田原隆、岡田誠治.  
本邦でのAIDS-related lymphomaの診療実態調査. 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
  - 2) 塚崎邦宏、渡辺隆、吉村健一、木下朝博、鏡味良豊、伊藤国明、小椋美知則、加藤晴美、山口素子、黒澤光俊、笠井正晴、飛内賢正、鈴木孝世、薄井紀子、正木康史、末岡栄三郎、張高明、永井宏和、安藤潔、大西一功、畑裕之、吉田功、松田信、前田嘉治、向井清、中村栄男、大島孝一、堀田知光、下山正徳. 多施設共同臨床試験併合解析による末梢T/NK細胞性リンパ腫の新たな予後予測モデル (JCOG0108A) 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
  - 3) 萩原和美、小栗佳代子、堀田知光、永井宏和.  
癌抑制遺伝子としてのPROX1の機能解析. 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
  - 4) 鈴木康裕、横澤敏也、萩原彰人、青木恵津子、加藤千明、大橋春彦、堀田知光、濱口元洋、永井宏和. 高齢者急性骨髄性白血病における救済化学療法としてのGemtuzumab Ozogamicin (GO). 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都

- 5) 小島勇貴、萩原彰人、森谷鈴子、鈴木康裕、横澤敏也、青木恵津子、大橋春彦、市原周、濱口元洋、堀田知光、永井宏和. HIV陰性HHV-8 陰性のprimary effusion lymphoma の一例. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
- 6) 萩原彰人、鈴木康裕、青木恵津子、森谷鈴子、間宮均人、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、堀田知光、市原周、濱口元洋、永井宏和. HAARTと強力化学療法を併用したAIDS関連Burkitt lymphoma/leukemiaの 3 例. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
- 7) 萩原彰人、森谷鈴子、鈴木康裕、青木恵津子、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、堀田知光、市原周、濱口元洋、永井宏和. AILTと診断されたMTX関連リンパ増殖症(MTX-LPD)の 1 例. 第 48 回日本リンパ網内系学会総会、2008 年 6 月 13, 14 日、札幌
- 8) 永井宏和. 悪性リンパ腫の臨床—エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫 (シンポジウム). 第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年 11 月 26-28 日、大阪
- 9) 永井宏和. 末梢血幹細胞移植の今日的課題、臨床応用の現況と将来 悪性リンパ腫 (シンポジウム)、第 52 回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会、2008 年 10 月 25 日、名古屋.

## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他

## 日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化

分担研究者 照井 康仁 癌研究会 癌研有明病院・血液腫瘍科  
癌化学療法センター・臨床部 血液腫瘍科担当部長

**研究要旨** 日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化のため、1) B細胞性リンパ腫における CD20 変異の解析、2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化に関する影響、3) EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析、4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析行なった。B細胞性リンパ腫の標準治療におけるリツキシマブの耐性化やウイルス活性化の機序に迫る臨床的基礎データの集積を行なうことで、エイズ関連リンパ腫治療プログラムの最適化に寄与した。

### A. 研究目的

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) は、年々その感染者が増加しているが、HAART 療法のような有効な薬剤治療法が開発され、HIV-1 感染者の治療状況は大幅に改善された。生存が改善される一方で、HIV に関連した疾患、特に悪性リンパ腫の発症は懸念されるところである。そのため、日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化は急務である。

HIV 関連リンパ腫のうち、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse Large B cell Lymphoma, DLBCL) は EB ウイルス感染との関連で注目されている。また、HIV 非感染の非ホジキンリンパ腫の中で最も多い組織型は DLBCL であり、治療の標準化もされていることから HIV 関連リンパ腫治療モデルの一つと成り得ることが想定される。

DLBCL の標準治療には、B 細胞の細胞表面にある CD20 分子を標的とした抗体医薬であるリツキシマブと CHOP 療法（エンドキサン、ドキシソルビシン、オンコビン、プレドニゾロン）の

併用療法があり、CHOP 療法との比較でその奏効が有意に改善することが報告されている。

リツキシマブ治療の有害事象として最も多く見られるものは、アレルギーを主体としたインヒュージョン・リアクションであり、その他はほとんど見られない。しかしながら、最近になって遅発性の好中球減少や免疫グロブリンの低下など免疫系への影響が少なからず報告されるようになってきている。また、リツキシマブ治療への耐性化も問題となっており、その機序と対応策は解決すべき事柄である。

我々は、日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化のため、1) B細胞性リンパ腫における CD20 変異の解析、2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化に関する影響、3) EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析、4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析行なった。B細胞性リンパ腫の標準治療におけるリツキシマブの耐性化やウイルス活性化の機序に迫る臨床的基礎データの集積を行なうことで、エイズ関連リンパ腫治療プログラムの最適

化に寄与することを試みた。

## B. 研究方法

### 1) B 細胞性リンパ腫における CD20 変異の解析

B 細胞性リンパ腫の 50 症例のリンパ節検体を浮遊細胞にして MACS により CD19 陽性細胞を採取する。それらの細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により CD20cDNA を合成した。その cDNA の塩基配列をシーケンサーにより決定した。

変異遺伝子のクローニングと発現型の再構成実験を行ない、変異遺伝子の意義について検討を行った。

また、遺伝子解析による変異群間のリツキシマブ治療に関する奏効性と無増悪期間の比較を統計学的に行なった。

### 2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化にする影響

C 型肝炎ウイルスに感染した B 細胞性リンパ腫患者において免疫グロブリン、HCV mRNA、肝機能検査 (GOT, GPT など) を施行し、その推移を比較検討した。

### 3) EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析

HIV 非感染リンパ腫における EBV 感染を LMP 免疫染色や血清学的検査で評価し、HIV 非感染リンパ腫における CD4/CD8 比、CD4 細胞数との関連を解析した。

### 4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析

材料と方法:EBV 陽性エイズ関連 DLBCL 10 例、EBV 陰性エイズ関連 DLBCL 10-20 例、および非エイズ患者に発症した EBV 陰性 DLBCL 10 例の凍結生検体 (5mm 角程度) を下記要領にて採取し、凍結保存する。すべての検体はインフォームドコンセントのもと採取される。

検体採取、保存法:生検、または剖検時に採取したリンパ腫組織と思われる組織を滅菌シャーレの上に載せ、滅菌ハサミまたはナイフで 5mm 角以下になるよう細切する。組織片を 1.5ml の血清チューブに移し、個人情報かわからないように番号付けをしてそのまま -80℃ で保存する。

DNA マイクロアレイ:凍結保存された検体か

ら RNA を抽出し、RT 反応後、蛍光ラベルし、DNA マイクロアレイ (アフィメトリクス社、またはマイクロダイアグノースティクス社) を用いて遺伝子プロファイルを決定する。

## (倫理面への配慮)

ヒト由来試料 (末梢血・リンパ節検体等) を用いた研究は、癌研究会倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施している。また、遺伝子解析においてはゲノム等解析倫理委員会の承認を得た上で「癌研究会倫理指針」に従い実施している。

### 1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮

研究に用いる末梢血、生検検体は、他の研究目的には使用しない。末梢血、生検検体は匿名処理を行うため、個人情報流出することはない。また、同意書に署名後も試料採取・使用までの期間に同意を撤回することを可能としている。

### 2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

### 3) 危険性の排除

生検検体はリンパ節を切り出した後で、通常のリンパ節生検同様に採取するため、患者の身体への影響はない。また、リンパ節の採取は患者の状態が安全な時のみに限るとし、リンパ節採取によって患者の状態の危険性が増す可能性を排除している。

末梢血は、医師が問診した上で、検査技師、看護師、あるいは医師が採血している。採血に伴う身体への危険性はあるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。一回の採取量は 10-100 ml であり、採血量は、本人の了解のもとに通常の採血と同様に決定している。

### 4) インフォームドコンセントに係わる状況

リンパ節採取に関しては、協力医療機関の医療スタッフ (医師) が本研究の趣旨を説明し、リンパ節生検手術の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医療スタッフ名を明記し、同意書は協力医療機関において厳重に保管している。

末梢血採取に関しては、癌研究会癌研有明病

院のスタッフ（医師）が本研究の趣旨を説明し、末梢血提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医師名を明記し、同意書は癌研有明病院において厳重に保管している。

## C. 研究結果

本年度は以下の研究を行なった。

### 1) B細胞性リンパ腫におけるCD20mutationの解析

抗CD20抗体抵抗性におけるCD20変異の関与についての報告はないが、我々は、B細胞性リンパ腫の50症例のCD20遺伝子解析において、C末端欠損型(8%)、細胞外ドメイン型(2%)、膜貫通ドメイン型(2%)、早期終止型(10%)の4つの変異型を見出した。特にC末端欠損型ではCD20の細胞表面発現が正常型に比べて有意に低下していた。抗CD20抗体に対する奏効率では、正常型とC末端欠損型でCR率、非CR率に有意差はみられなかったが、C末端欠損型で非CR率が高い傾向があった。抗CD20抗体療法後の無増悪期間中央値が正常型とC末端欠損型でそれぞれ31ヶ月と7ヶ月でlog-rank試験で有意差がみとめられた。この結果はClinical Cancer Researchで2009年に掲載予定である。

### 2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化に関する影響

リツキシマブ併用化学療法はB細胞性リンパ腫の標準治療であるが、HBV感染症例でのリツキシマブ投与は抗ウイルス薬の投与などをしながら、HBVの再活性化や肝機能障害の悪化には十分な観察が必要とされる。一方、HCV感染症例の場合はそのような配慮は必要としないとされているため、十分な解析がなされていない。我々は、HCV感染症例でB細胞性リンパ腫を併発し、リツキシマブ投与後のHCV RNA量とIgG量の追跡をおこなった。リツキシマブ投与後、HCV RNA量は5例中5例で増加がみられ、そのうち1例で肝機能障害がみとめられた。また、IgG量の減少も同時にみとめられ、HCVウイルス活性化との関係が示唆された。HCVやHBVに限らず、様々なウイルス感染で同様の現象がみられる可能性があり、注意が必要である。

### 3) EBウイルス感染およびCD4/CD8比におけるリンパ腫症例の解析

エイズ関連リンパ腫はその多くがEpstein-Barr virus(EBV)陽性のdiffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であり、EBVによる日和見腫瘍と考えられてきたが、HIV非感染リンパ腫におけるEBV感染をLMP免疫染色や血清学的検査、血中EBV-DNA量で評価した。現在、平成19年度同様、症例を重ねているところである。また、HIV非感染リンパ腫におけるCD4/CD8比、CD4細胞数との関連に関しても平成19年度同様、症例を集めているところである。

### 4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析

エイズ(AIDS、acquired immunodeficiency syndrome)はHIV感染により宿主が免疫不全に陥り、さまざまな日和見感染症を合併する疾患である。エイズではカポジ肉腫やリンパ腫など悪性腫瘍が合併する頻度が高いことが知られており、特にエイズ関連リンパ腫は患者の予後を左右する重要な合併症である。エイズ関連リンパ腫はその多くがEpstein-Barr virus(EBV)陽性のdiffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であり、EBVによる日和見腫瘍と考えられてきた。しかし、近年のわれわれの調査では、highly active anti-retroviral therapy (HAART)導入以降、EBVの陽性率は著しく下降しており、現在ではエイズ関連リンパ腫の約半数がEBV陰性のリンパ腫(とくにDLBCL)である。エイズ患者におけるEBV陰性リンパ腫の発症機構は不明な点が多く、その解析はされていない。エイズ関連リンパ腫は治療抵抗性のものが多く、現在も重要な死因の一つである。エイズ関連リンパ腫の病態が明らかにされ、病態に応じた治療法が開発されることが望まれる。そこで、遺伝子プロファイルによるエイズリンパ腫の再分類と病態の解明を行う際に、エイズ患者に発症したリンパ腫を非エイズ患者に発症したリンパ腫と比べることは重要であると考えられる。

そこで、エイズリンパ腫および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子プロファイルを



比較し、エイズリンパ腫の再分類と病態の解明を行うために、竹内賢吾（癌研究会 癌研究所 病理部 研究員）、片野晴隆（国立感染症研究所 感染病理部 室長）渡邊俊樹（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 病態医療科学分野 教授）との共同研究で以下のような計画を行い、当院遺伝子解析倫理委員会にて承認され、10例中8例が登録された。

#### D. 考察

B細胞性リンパ腫細胞内の microsatellite instability による遺伝子変異原性を検討したが、高い遺伝子変異原性はみられなかった。しかしながら、リツキシマブの標的分子である CD20 分子の変異が見られており、細胞内での遺伝子変異の頻度が高くなっている可能性がある。HIV 感染患者の HIV ウイルス粒子の変異頻度も高いことが知られているが、HIV 感染者へのリツキシマブ治療時の易耐性性も考慮する必要があると考えられた。

また、リツキシマブ治療においては、IgG 量の減少も HCV ウイルス活性化と同時にみとめられており、リツキシマブによる IgG 減少が HCV ウイルス活性化と関係していることが示唆された。すなわち、HCV や HBV に限らず、HIV などの様々なウイルス感染でもリツキシマブによる IgG 低下現象とウイルス活性化という同様の現象がみられる可能性があり、注意が必要である。

現在、DLBCL に関する EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析を行なっているが、これも HIV 関連リンパ腫の病態とリツキシマブ治療の意義を明らかにするものである。

#### E. 結論

1) B細胞性リンパ腫における CD20mutation の解析

平成20年度に引き続き、B細胞性リンパ腫における CD20mutation に関して解析するが、CD20mutation の簡便検出法を開発することで臨床応用を行なう必要がある。実際には、PCR 法を応用した高性能で簡便な遺伝子変異検出法を開発し、薬剤奏効性と予後と

の関連を解析する。

1. 変異体データベースにより、変異高頻度領域を決定し、その領域に対する蛍光標識 PCR プライマーを設計、作製する。
2. informed consent 済みの症例検体からの DNA を用いて PCR を行い、PCR 産物を得る。
3. 正常型および変異型 PCR 産物 DNA の変性温度の違いを解析する。
4. 変性温度の違いによる蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer ; FRET) を利用して、遺伝子変異を高感度で検出する。
5. 分子標的薬剤における薬剤奏効性と予後に関して上記の変異体との関連について統計的手法を用いて解析する。

上記のシステムを構築する事で HIV 関連および非関連リンパ腫におけるリツキシマブ耐性機序を解明する。

2) EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析

平成20年度に引き続き、HIV 非感染リンパ腫における EBV 感染を LMP 免疫染色や血清学的検査、血中 EBV-DNA 量で評価し、200症例の解析を行なう必要がある。また、HIV 非感染リンパ腫における CD4/CD8 比、CD4 細胞数との関連に関しても解析する。この解析で HIV 関連および非関連リンパ腫の類似点、相違点を探究する事ができると考えられる。

- 3) HIV 感染および非感染びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における遺伝子プロファイリング
- 4) に関する研究 IRB による承認後、以下の研究を
- 5) 継続する。

1 材料と方法：EBV 陽性エイズ関連 DLBCL 10 例、EBV 陰性エイズ関連 DLBCL 10-20 例、および非エイズ患者に発症した EBV 陰性 DLBCL 10 例の凍結生検体 (5mm 角程度) を下記要領にて採取し、凍結保存する。すべての検体はインフォームド Consent のもとで採取される。

## 2 検体採取、保存法

生検、または剖検時に採取したリンパ腫組織と思われる組織を滅菌シャーレの上に載せ、滅菌ハサミまたはナイフで5mm角以下になるよう細切する。組織片を1.5mlの血清チューブに移し、個人情報が出ないように番号付けをしてそのまま-80℃で保存する。

## 3 DNA マイクロアレイ

凍結保存された検体から RNA を抽出し、RT 反応後、蛍光ラベルし、DNA マイクロアレイ (アフィメトリクス社、またはマイクロダイアグノースティクス社) を用いて遺伝子プロファイルを決定する。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ennishi D, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Increased incidence of interstitial pneumonia by CHOP combines with rituximab. I. J. Hematology. Int J Hematol. 87(4):393-7, 2008.

2) Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, Asai H, Mishima Y, Terui Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Yamaguchi M, Suzuki R, Tanimoto M, Hatake K. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. Ann Oncol 19(11):1921-6, 2008.

3) Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Taniyama A, Kuniyoshi R, Takizawa T, Kimura S, Ozawa K, Hatake K. Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the

resistance to tyrosine kinase inhibitors. Cancer Sci. 2008 Sep 22, in press.

4) Ennishi D, Yokoyama M, Terui Y, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Does rituximab really induce hepatitis C virus reactivation? J Clin Oncol. 26(28):4695-6, 2008.

5) Ennishi D, Yokoyama M, Terui Y, Asai H, Sakajiri S, Mishima Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Takeuchi K, Tanimoto M, Hatake K. Soluble interleukin-2 receptor retains prognostic value in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP (RCHOP) therapy. Ann Oncol. 20(3), 526-533, 2008.

6) Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, Kuniyoshi R, Taniyama A, Yokoyama M, Sakajiri S, Takeuchi K, Watanabe C, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Identification of CD20 C-Terminal Deletion Mutations Associated With Loss of CD20 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma. Clin Cancer Res. 2009, in press.

7) Mishima Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Terui Y, Takeuchi K, Asai S, Ennishi D, Asai H, Yokoyama M, Kojima K, Hatake K. An imaging-based rapid evaluation method for complement-dependent cytotoxicity discriminated clinical response to rituximab-containing chemotherapy. Clin Cancer Res. 2009, in press.

和文

1) 照井康仁: 抗CD22 抗体の基礎と臨床 がん分子標的治療の最先端 医学のあゆみ 224(1) 27-31, 2008

- 2) 照井康仁：心配しないでいいですよ 再発・転移多発性骨髄腫 真興交易（株）医書出版部 畠清彦編集，2008.
- 3) 照井康仁：抗CD22 抗体の基礎と臨床 医学のあゆみ 224(1) 27-31, 2008.
- 4) 照井康仁、畠清彦：1. 血液領域の癌の外来治療 I. 各科領域における外来化学療法 がんの外来化学療法のマネジメント 改訂版 畠清彦編 マネジメントシリーズ 28-37, 2008
- 5) 畠清彦、横山雅大、照井康仁：抗体医薬：CD20 抗体、CD52 抗体 抗体エンジニアリングと抗体医薬 Medical Science Digest 34(5) 26-28, 2008.
- 6) 照井康仁：限局期アグレッシブリンパ腫に対する放射線照射の意義 血液・腫瘍科 57(1) 21- 24, 2008
- 7) 照井康仁：悪性リンパ腫に対する化学療法ー臨床医に求められる基礎知識 悪性リンパ腫と闘う：治癒を目指すために必要な治療手段 内科 102(2) 271-274, 2008.
- 8) 照井康仁：IV-3 血液疾患の研究ー トランスレーショナルリサーチー 腫瘍内科オリエンテーション 畠清彦編 医薬ジャーナル p140-147, 2008.
- 9) 照井康仁、畠清彦：4 6 造血器腫瘍 第V部 がんの分子標的治療薬のトランスレーショナルリサーチ がんの分子標的治療 鶴尾隆編 南山堂 387-391, 2008
- 10) 照井康仁：ibritumomab tiuxetan (90Y標識マウス型CD20mb) エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2009 有吉寛監修 メディカルレビュー社, 512-514, 2008

#### H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

## エイズ合併リンパ腫の分子標的治療法開発に関する研究

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科  
メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 教授

研究協力者： 片野晴隆（分担研究者：国立感染症研究所感染病理部）  
石田尚臣、三宅在子、Nazanin Dabagmanesh（東京大学大学院新領域科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）  
堀江良一（北里大学医学部）  
梅澤一夫（慶應義塾大学理工学部）

**研究要旨** エイズ合併リンパ腫のモデルとして、PEL 細胞株と B リンパ腫由来細胞株を用いて以下の実験を行った。（１）PEL 細胞株を用いて、恒常的な NF- $\kappa$ B を標的とした DHMEQ の作用機序の解析を継続した。DHMEQ 処理の有無による遺伝子発現の変化について発現アレイ解析を用いて包括的に解析した。その結果、IL-6, Myc, CCR5, NF $\kappa$ B1 などの標的遺伝子の発現抑制と、アポトーシスや細胞周期停止にかかわる遺伝子の発現更新が確認された。（２）B 細胞リンパ腫細胞株に対する PKC $\beta$ 阻害剤の作用を検討した。in vitro では細胞増殖、アポトーシス誘導を検討した。その結果、PKC $\beta$ 阻害剤は B 細胞株に細胞死を誘導したが、その感受性から 2 群に分かれた。Namalwa 細胞は EB 陰性 B-JAB 細胞と同様の高い感受性を示したが、Raji 細胞は LCL と同様に相対的な耐性をしめした。これらの細胞は NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ に対する感受性には差がなかったが、Raji 細胞と LCL では、PKC $\beta$ 阻害剤による NF- $\kappa$ B 活性の阻害が認められなかったことから、NF- $\kappa$ B 活性阻害の有無が感受性を規定している可能性が示された。（３）エイズリンパ腫サンプル 20 例から RNA を抽出して遺伝子発現プロファイル解析を試みたが、解析の結果 RNA の degradation のため解析には適さない事が明らかになった。

### A. 研究目的

HIV 感染者はエイズ発症期に、ニューモシスチス肺炎やサイトメガロウイルスなどの日和見感染症の他にカポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍が合併する。近年の highly active anti-retroviral therapy (HAART)の導入により、多くの日和見感染症は減少する傾向にあるが、カポジ肉腫、リンパ腫は逆に発症率としては増加傾向にある（平成 18 年度 厚生労働科学研究

費 エイズ対策研究事業「重篤な日和見感染症の早期発見と最適治療に関する研究」報告書）。エイズに合併するリンパ腫は（AIDS-related lymphoma, ARL）一般に進行が早く、コントロールが困難で致死率も高い。このようなリンパ腫のほとんどは diffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であり、その約半数に Epstein-Barr virus (EBV)の感染が認められる。また、2001 年の WHO 分類で、HHV8/KSHV の感染が診断基

準とされた Primary Effusion Lymphoma (PEL)は、その約80%が HIV 感染者に認められる

(Kobayashi et al., Act Haematol 2007;117:132)。ARL の中で PEL が占める割合は5%以下とされており(Chen et al., The oncologist 2007;12:569)、頻度は少ないが、エイズ患者に高発し、50%生存期間 6.2 ヶ月と言う予後不良のウイルス性の悪性リンパ腫である(Boulanger et al., J Clin Oncol 2005;23:4372)。

HIV 感染者の 5~20%の例でエイズ合併リンパ腫(ARL)を発症するとされ、3-4%においてはその発症が AIDS の診断につながっている(Little et al., JAMA 2001;285,1880)。HAART の導入後 ARL の発症は減少しているが、最も減少したのは中枢神経原発のリンパ腫である。ARL は依然としてエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、その治療法の開発は急務である。

我が国において ARL の約半数を占める EBV 陽性リンパ腫は、PEL と共に、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化している事が知られている。本研究においては、この恒常的活性化 NF- $\kappa$ B を治療の分子標的として応用する事を検討した。既に報告されている論文において用いられている薬物は NF- $\kappa$ B 活性化シグナル伝達の key player である IKK の阻害剤や多彩な機能を有する proteasome 阻害剤を用いたものである。本研究に用いる阻害剤 DHMEQ は p65RelA の核内移行阻害と言う、特異な作用を持つ事から、その作用は大変期待される。実際、分担研究者らは既に NF- $\kappa$ B の恒常的活性化を特徴とする種々のリンパ性悪性腫瘍においてその作用を検証し、有効性を報告してきている。

本研究では、前年度に、EBV 陽性 ARL のモデルとしては、健常人末梢血単核球 (PBMC) に EBV を感染させて樹立した LCL を用い、PEL については細胞株を使用して、NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ による NF- $\kappa$ B 活性抑制効果および細胞死誘導能を検討した。さらに、EBV 感染初期の PBMC に DHMEQ を作用させ、LCL 樹立に至る過程での DHMEQ の効果を検討した。

今年度は、PEL 細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイを用いて検討した。さらに、既に臨床治

験が始まっている、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ種の PKC $\beta$ 阻害剤の作用を参考に、種々の PKC 阻害剤の EBV 陽性 B リンパ腫細胞株に対する作用を in vitro で検討した。最後に、エイズリンパ種の発現アレイ解析を試みたが、予備実験において、サンプル RNA の劣化が確認されたことから、適切な検体が得られるまで解析を保留する事とした。

## B. 研究方法

### (1) PEL細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用

PEL 細胞の培養液中に DHMEQ を添加し、細胞性遺伝子の発現変化を Agilent 社の発現アレイ解析システム (Whole Human Genome Oligo Microarray Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)) を用いて検討した。解析には GeneSpring GX (Agilent)を用いて Gene Ontology 解析を行った。

### (2) B 細胞リンパ腫細胞に対する PKC 阻害剤の作用の検討

EBV 感染 B 細胞株(Namalwa, Raji, )および LCL 細胞を用いた。これらに PKC 阻害剤 Staurosporine を各種の濃度及び時間で作用させ、細胞の生存率、アポトーシス誘導、シグナル伝達、NF- $\kappa$ B 活性などを検討した。また、これらの細胞の NF- $\kappa$ B 阻害剤に対する感受性を DHMEQ を用いて検討した。

### (3) エイズリンパ腫の遺伝子発現アレイ解析

エイズリンパ腫検体 20 例 (都立駒込病院 10 検体、国立感染症研究所 10 検体)を用いて、Trisol (In vitrogen)を用いて Total RNA を抽出し、その quality を Bio Analyzer (Agilent)を用いて解析した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認 (平成 19 年 6 月 4 日 承認番号 107022) を得た上で、同研究所の動物実験施設内感染実験区 (P2 施設) で行われた。

## C. 研究結果

### (1) PEL細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用

PEL 細胞株に体する DHMEQ の効果は一過性であり、処理した HHV-8 感染 PEL 細胞株 (BCBL1, TY1, BC1) の核抽出液を用いた EMSA で、NF- $\kappa$ B 活性が 1 ~ 3 時間後に抑制されたが、効果は一過性で 24 時間後には回復する事が示されている (図 1)。

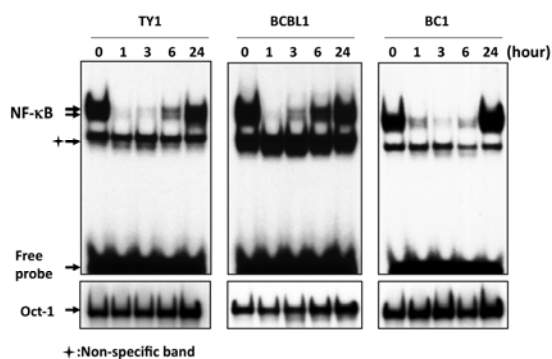


図 1. DHMEQ による一過性の NF- $\kappa$ B 活性化抑制. 10 $\mu$ g/ml の DHMEQ 処理後時間経過を追って各抽出液を調製し EMSA 法によって NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を検討した。

次に、DHMEQ による NF- $\kappa$ B 活性抑制が遺伝子発現に与える影響を Agilent 社のシステムで再検討した (図 2)。

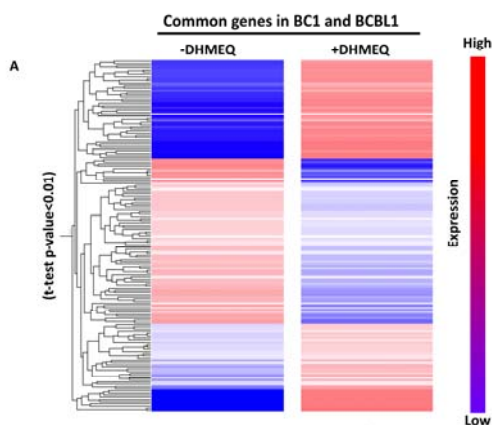


図 2. DHMEQ 処理による PEL 細胞の遺伝子発現変化 BC1 細胞と BCBL1 細胞で共通の変化を示す遺伝子群を抽出してクラスター解析を行った。

発現が有意に増加あるいは減少した遺伝子 (t test p value < 0.01) 群を抽出した。その結果、発現抑制が認められた遺伝子は 72、発現が誘導された遺伝子は 71 個となった。

NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の中で発現抑制が認められ

たものには以下のようなものがある。

IL6, myc, CCR5, BCL-xL, cIAP2, NF- $\kappa$ B1

また、抗アポトーシス遺伝子で発現抑制が認められた遺伝子には以下のものがある。

Bcl-xL, c-IAP2, NF- $\kappa$ B1, Birc5, IGF1R

一方、発現亢進が認められた遺伝子には以下のようなものがあった。

SSP1, VEGF, MIF, BAG3

プロアポトーシス遺伝子で発現亢進が認められた遺伝子には以下のものがあった。

DEDD2, CDKN1A, APOE, TNFSF10

細胞周期停止遺伝子で発現亢進の認められた遺伝子には以下のものがある。

CDKN1A, CDKN1B, PPP1R15A, DDIT3

これら発現が有意に変化した遺伝子群に関して GeneSpring GX を用いて Gene Ontology で解析した (図 3)。

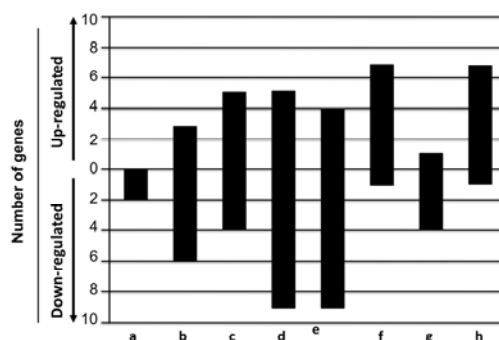


図 3. Gene Ontology 解析の結果。

グラフは以下のカテゴリーの遺伝子の数を示している。a, negative regulators of NF- $\kappa$ B import into nucleus; b, I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B cascade; c, positive regulators of apoptosis; d, negative regulators of apoptosis; e, DNA repair; f, cell cycle arrest; g, cell cycle checkpoint; h, regulators of cyclin dependent protein kinase activity. 各領域は発現亢進あるいは抑制を示す遺伝子の数を反映している。

解析の結果、以下の機能群に属する遺伝子の発現抑制が認められた。

- (1) negative regulators of NF- $\kappa$ B import to the nucleus,
- (2) I- $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B cascade
- (3) negative regulators of apoptosis
- (4) DNA repair
- (5) cell cycle checkpoint.

一方、以下のカテゴリーに属する遺伝子につ

いては発現亢進の傾向が認められた。

(1) positive regulators of apoptosis

(2) cell cycle arrest

(3) regulators of cyclin dependent protein kinase activity

全体をまとめると、アポトーシス促進と細胞周期停止遺伝子の発現亢進の傾向と、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子、抗アポトーシスと DNA 修復にかかわる遺伝子の発現抑制が認められた。

従って、PEL 細胞における NF- $\kappa$ B の恒常的活性化は細胞の増殖と生存に必須な事象である事が示唆された。

## (2) B 細胞リンパ腫細胞に対する PKC 阻害剤の作用の検討

まず、実験に用いる培養細胞における各種 PKC 分子の発現と PKC $\beta$ の活性を評価した。Immunoblot による解析の結果、これらの細胞株では、PKC の $\alpha, \beta, \gamma$ および $\delta$ の発現が確認されたが、 $\theta$ の発現はいずれの細胞においても認められなかった (図 4)。

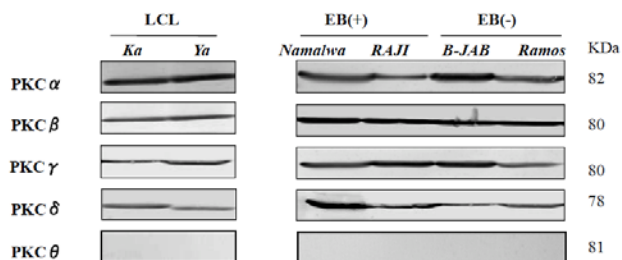


図 4. B 細胞株における PKC アイソフォームの発現  
細胞株の whole cell extract を SDS-PAGE で分画後、PVDF メンブレンに転写し、各 PKC 特異抗体を用いてプロットした。

次に、B 細胞受容体からのシグナル伝達に必須の役割を持つ PKC $\beta$ についてその活性化状態を 2 つの方法で検討した。まず、SigmaTect Protein kinase C assay system (Sigma)を用いて測定したところ、これらの B 細胞株では、未刺激の状態で対照の TPA 刺激後の Jurkat 細胞と同等あるいはそれ以上の活性を示した (図 5 a)。従って、これらの細胞においては PKC $\beta$ の恒常的かつ強力な活性化が存在する事が示唆された。さらに、活性化 PKC は膜分画に存在する事から、生化学的に細胞質分画と膜分画に分けて

immunoblot 法によってその局在を解析した (図 5 b)。その結果、やはりこれらの B 細胞株全てにおいて、PKC $\beta$ の膜局在が確認できた。これらのデータを総合すると、B 細胞培養株では、EBV の感染の有無にかかわらず、PKC $\beta$ の高いレベルでの恒常的活性化が存在する事が示された。

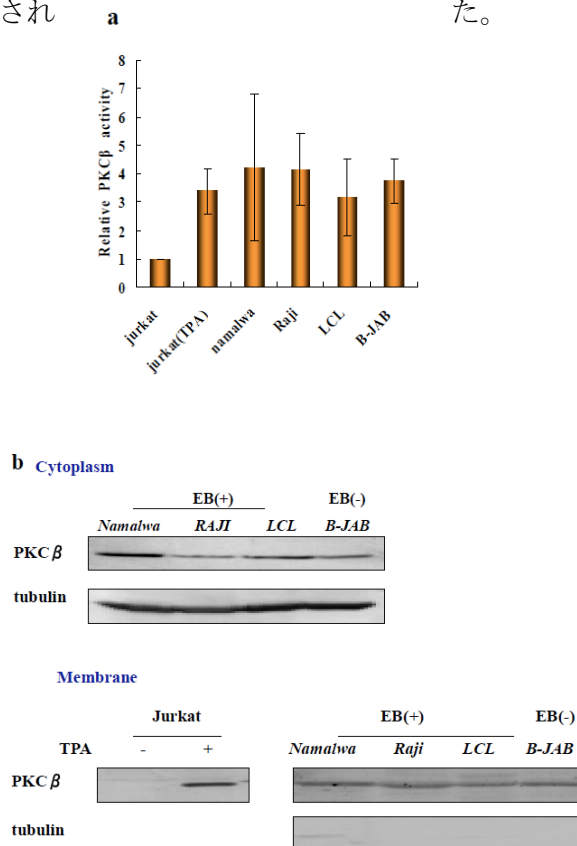


図 5. B 細胞株における PKC $\beta$ の恒常的活性化。

a) SigmaTect Protein kinase C assay system (Sigma)による測定結果。Jurkat 細胞の TPA 刺激有り無しの検体を対照としている。b) PKC $\beta$ の細胞内局在の解析。生化学的に細胞質と膜成分を分画し、それぞれを immunoblot 法で解析した。対照には TPA 刺激有り無しの Jurkat 細胞の検体を用いた。

次に、これらの細胞株に対する PKC $\beta$ 阻害剤 (Staurosporine) の影響を検討した。まず、細胞死の誘導について検討したところ、いずれの細胞も感受性を示したが、その程度は 2 群に分かれた。つまり、Raji 細胞と LCL は 0.065 $\mu$ M においても relative viability が 60%以上であり、Namalwa および B-JAB 細胞株が、10-20%であるのと比較して、相対的な耐性を示した (図 6)。



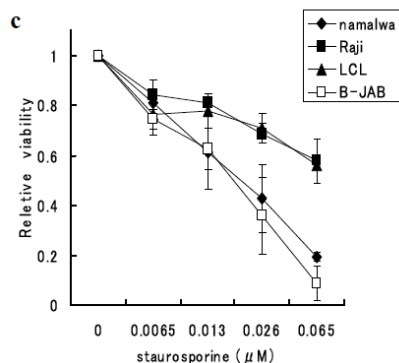


図 6. PKC $\beta$ 阻害剤による細胞死誘導。

Staurosporine 添加 48 時間後に、WT-8 アッセイ生細胞数を評価し、相対的生存率で表現した。

次に、細胞死がアポトーシスによるものかどうかを検討するために、Staurosporine 添加後の細胞について、Caspase-3, -8, -9 の活性化の有無を green-fluorochrome-labeled inhibitors of caspase (FLICA)によって検討した。その結果、相対的な高感受性を示した Namalwa 細胞と B-JAB 細胞で明らかな活性化が認められたが、Raji 細胞と LCL では、活性化が低レベルであった(図 7)。

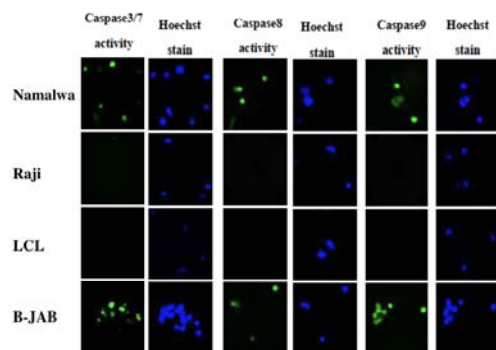
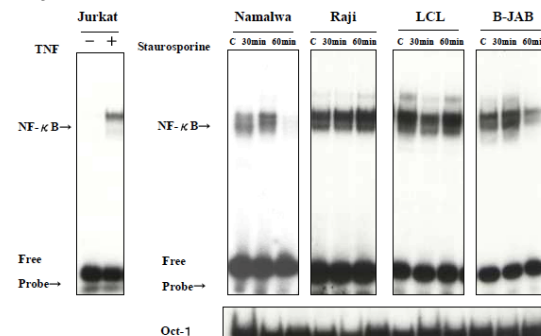


図 7. Staurosporine 添加による caspase の活性化。

添加後 8 時間で細胞を固定し、それぞれの caspase の活性化を FLICA で検討した。また、Hoechst33342 染色の結果を右に示す。

更に、Staurosporine 処理による NF- $\kappa$ B 活性化に対する効果を EMSA 法で検討した。その結果、相対的に高い感受性を示した Namalwa 細胞と

B-JAB 細胞においては、NF- $\kappa$ B の活性化が強く阻害されていた。一方相対的な耐性を示した Raji 細胞と LCL では、ほとんど活性が阻害され



ていなかった (図 8)。

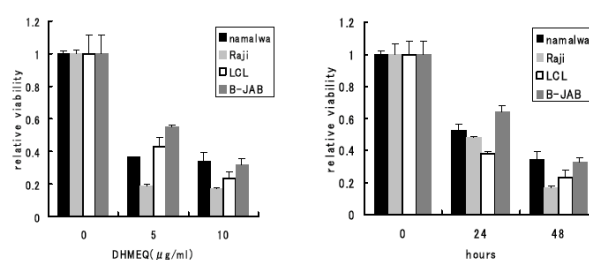
図 8. PKC $\beta$  阻害による NF- $\kappa$ B 活性の抑制。

Staurosporine 処理後 30 分と 60 分で各抽出液を調整し EMSA を行った。EMSA の対照としては、Jurkat 細胞を用い、TNF $\alpha$ による NF- $\kappa$ B 活性化を示した。

次に、NF- $\kappa$ B 阻害が細胞死に深くかかわっているかどうかを検討するため、NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用を検討した。その結果、これら 4 種の B 細胞株はいずれも DHMEQ に対して高い感受性を示した (図 9)。以上の結果は、Staurosporine 感受性は、その NF- $\kappa$ B 阻害作用を介している事が示唆された。

図 9. B 細胞株に対する DHMEQ の効果。

各濃度の DHMEQ 添加後 48 時間、あるいは 10 $\mu$ g/ml の DHMEQ 添加後各時間における生細胞の割合を示した。



次に、Staurosporine 感受性に影響する EB ウイルス側の因子を検討するため、NF- $\kappa$ B 活性化に深くかかわる LMP-1 の発現とそれへの TRAF2 蛋白質の会合レベルを検討した。その結果、相対的な耐性を示す Raji 細胞と LCL 細胞では LMP-1 の発現レベルが高く TRAF2 蛋白質の会合も強い事が明らかになった (図 10)。



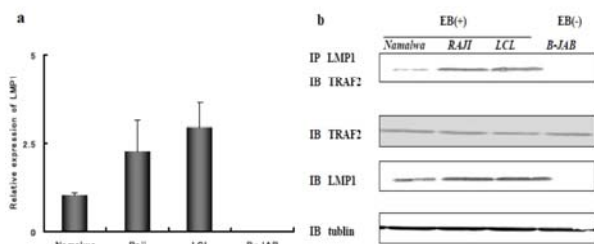


図 10. 各細胞における LMP-1 発現レベルの検討。  
a) Real time RT-PCR による LMP-1 mRNA レベルの検討結果。b) Immunoblot 法による蛋白質レベルでの発現解析。LMP-1 の発現レベルと TRAF2 蛋白質の共沈レベルの検討

### (3) エイズリンパ腫の遺伝子発現アレイ解析

都立駒込病院と国立感染症研究所で凍結保存されているエイズ合併リンパ腫検体計 20 サンプルを用いて RNA を抽出して発現アレイ解析を試みた。

発現アレイ解析を行うには検体の RNA の quality が重大な影響を持つ。従って、まず、抽出した RNA の quality check を行った。Agilent 社の Bio Analyzer を用いて解析したところ、いずれのサンプルも著しく degradation している事が明らかになった (図 10)。

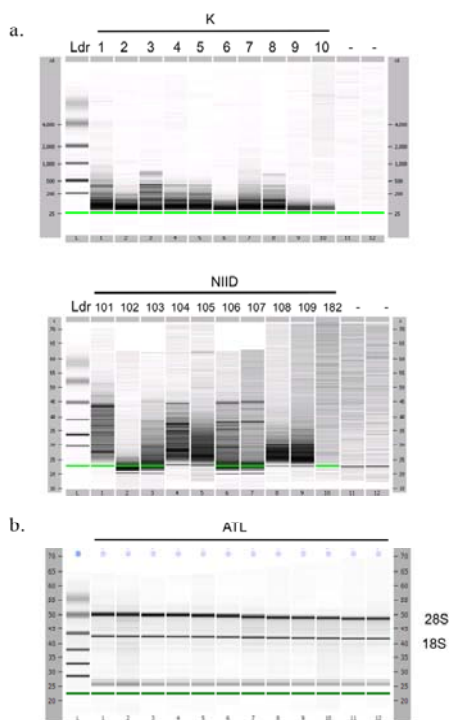


図 10. エイズ合併リンパ腫の RNA 品質チェック

Bio Analyzer の解析結果を示す。a. エイズリンパ腫検体の解析結果。b. 対照としての ATL 細胞の RNA 解析結果 28S および 18S の ribosomal RNA がシャープなバンドを形成している事が劣化の無い RNA の目安となる。

### D. 考察

本年度は、昨年度に引き続き、PEL 細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の効果を遺伝子発現の包括的解析によって検討した。

その結果、DHMEQ が一過性に NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが確認された。24 時間以内に NF- $\kappa$ B の活性が回復するにもかかわらず、2 日目以降は活性化 NF- $\kappa$ B の存在下でアポトーシスのプロセスが進行することになる。この現象がどのような分子機構によって担われているかは大変興味深い。今回の発現解析の結果は、一時的な NF- $\kappa$ B の阻害が広汎な遺伝子発現の変化をもたらす事、全体で見ると抗アポトーシス系の遺伝子の発現抑制とプロアポトーシス系の遺伝子の発現亢進が認められる事が特徴である。これは、最近提唱されている”Oncogene addiction”および”Oncogenic shock”という概念に良く適合するデータである。

本年度は、新たに B 細胞系リンパ腫に対する PKC $\beta$ 阻害剤の効果を、EBV 陽性の Namalwa 細胞、Raji 細胞および LCL と EBV 陰性の B-JAB 細胞を用いて検証した。本年度の実験結果から明らかになった事は、PKC $\beta$ 阻害剤 Staurosporin に対する感受性が、恒常的に活性化している NF- $\kappa$ B を阻害できるかどうかと相関する事である。EBV 感染 B 細胞株では LMP-1 の発現と TRAF2 蛋白質との会合のレベルが高い細胞では、Staurosporin による PKC $\beta$ の阻害にもかかわらず NF- $\kappa$ B の活性化が維持されていた。従って、これらの細胞では NF- $\kappa$ B 活性が PKC $\beta$ 非依存経路、つまり、主に LMP-1 からのシグナルでドライブされている事を示唆する結果と考えられる。さらに、EBV 陽性リンパ腫の治療において、PKC $\beta$ 阻害剤の効果の限界を示唆する結果でもある。NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ が EBV の有無にかかわらず有効であった事は、両者の併用療法の有効性を示唆すると考えられる。

本年度の解析で、エイズ合併リンパ腫臨床検体を用いた発現解析は、現在の検体では実施困

難である事が明らかになった。今後は、プロスペクティブに検体の収集を行いアレイ解析可能なサンプルを準備するか、解析方法の見直しを考える必要が有る。プロスペクティブに患者検体を収集してマテリアルバンクを整備する事は必須の事であるが、患者数の少なさを考慮すると限られた期間内で発現アレイ解析の成果を期待する事は困難であると考えられる。従って、既存の検体を用いて有用な情報を取得する新たな実験計画を検討する事が必要であろう。この際、最近の技術開発の結果可能になって来た、高速シーケンサーを用いた全ゲノム解析を目指すのも一つの可能性であると思われる。

## E. 結論

今年度の結果から、DHMEQ による NF- $\kappa$ B 有効な戦略であることを確認するとともに、PKC $\beta$  阻害剤の応用は EBV 陽性リンパ腫の場合、DHMEQ との併用を検討する必要が有ることを示唆するものと考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T, Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ. **Microbes Infect** 10:748-756, 2008
- 2) Suzuki K, Juelich T, Lim H, Ishida T, Watanabe T, Cooper DA, Rao S, Kelleher AD. Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region. **J Biol Chem** 283: 23353-23363, 2008
- 3) Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T. Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF $\kappa$ B inhibitor DHMEQ **Biochem Biophys Res Commun** 376: 310-314, 2008
- 4) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A,

Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation **Cancer Sci** in press

- 5) Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Cooper DA, Kelleher AD, Suzuki K, Watanabe T. Retroviral delivery of Promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription **Microbes Infect** in press

### 2. 学会発表

(国際発表)

- 1) Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Suzuki K, Watanabe T, Promoter-targeted shRNA driven by retroviral vector achieves long-term repression of HIV-1 replication, 11th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, September 11-13, 2008, Maryland, USA

(国内発表)

- 1) 三宅在子、石田尚臣、DewanMD、Zahidunnabi、山本直樹、梅澤一夫、堀江良一、渡邊俊樹、NF- $\kappa$ B阻害剤DHMRQを用いたエイズリンパ腫治療の基礎研究、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 26 日-27 日、東京
- 2) Nazanin Dabaghmanesh, 三宅在子、片野晴隆、佐多徹太郎、梅澤一夫、堀江良一、渡邊俊樹、Inhibition of NF- $\kappa$ B by DHMEQ in primary effusion lymphoma destroys cancer cells without induction of viral replication. 第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 26-27 日、東京
- 3) 神林佑輔、鈴木絵里子、渡邊俊樹、堀江良一、梅澤一夫、エイズ関連リンパ腫細胞の表現型解析とNF- $\kappa$ B阻害(-)-DHMEQによる抑制、第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 26-27 日、東京
- 4) 三宅在子、山岸誠、石田尚臣、渡邊俊樹、SIV LTRプロモーター領域を標的としたsiRNAによるSHIV増殖抑制機構の解析、第 56 回日本ウィルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日、岡山
- 5) 山岸誠、石田尚臣、三宅在子、鈴木一雄、渡

邊俊樹、プロモーター標的shRNAを用いた  
HIV-1 の長期抑制効果とメカニズムの検討、  
第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年  
10 月 26-28 日、岡山

**H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）**

なし

## エイズ関連リンパ腫の分子病態に基づく治療法の開発

研究分担者： 片野 晴隆 （国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者： 菅野隆行 （国立感染症研究所感染病理部）  
渡邊俊樹 （研究分担者：東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）  
比島恒和 （東京都立駒込病院病理科）  
梅澤一夫 （慶應義塾大学理工学部）

### 研究要旨

1. エイズ関連リンパ腫における蛋白リン酸化酵素阻害薬の抗腫瘍効果: Epstein-Barr virus (EBV)関連日和見リンパ腫はEBVの癌タンパクLMP1 (Latent membrane protein 1) 陽性でNF-kBの恒常的活性化を特徴とする予後不良なリンパ腫である。われわれはJAK(Janus kinase), MEK(MAPK/ERK kinase) 阻害薬が、日和見リンパ腫のモデルであるEBV感染不死化細胞を 2-20 $\mu$ Mの濃度で増殖を抑制することを見いだした。増殖抑制はLMP-1 の発現と関連しており、これらの阻害薬はエイズ関連EBV感染日和見リンパ腫の新たな治療薬の候補であると考えられた。
2. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイル（ウイルス）の検索：近年EBV陰性エイズ関連リンパ腫が増加していることから、遺伝子発現プロファイルの違いによるエイズ関連リンパ腫の再分類を試みている。（研究分担者渡邊俊樹教授との共同研究）本年度はエイズ関連リンパ腫サンプル 20 例を収集し、基礎情報としてEBV, HIV, HHV-8 などのウイルスを検出した。

### A. 研究目的

エイズの治療としてHAART療法が導入されて以降、日和見感染症は減少したもののカポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍の発生は増加傾向にある。HAART療法そのものが治療として効果のあるカポジ肉腫と異なり、エイズ関連リンパ腫は治療が困難で予後不良の疾患である。エイズ関連リンパ腫のうち、本邦では現在、約半数ほどはEpstein-Barr virus (EBV) 陽性、LMP1(Latent membrane protein 1)陽性のEBV関連日和見リンパ腫に分類される。このリンパ腫は組織型としてはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL)

の免疫芽球タイプ(immunoblastic variant)とよばれるものであり、さらにEBVの感染様式としてはlatency III、すなわち、すべての潜伏感染遺伝子を発現している状態である。EBVの主要な癌タンパクであるLMP1が陽性でNF-kBは恒常的に活性化している。

このリンパ腫ではLMP1が活性化する様々なシグナル経路が形質転換に重要である。LMP1が誘導するシグナル経路にはおおまかに、NF-kBを活性化する経路、AP-1を活性化する経路、Jak-Statの経路の3つが知られている。いずれも転写因子の活性化から最終的には細胞増殖や抗アポトーシスなどの効果をもたらす。これらの経路はLMP1の細胞質内C末端にTRAF

TRADD, JAK3などが結合する活性化ドメイン CTAR(C-terminal activation region)1, 2, 3があり、これらを介して最終的にはNF- $\kappa$ B, AP1, STAT3といった転写因子の活性化を引き起こす。

昨年度は高コレステロール血症治療薬として用いられているHMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)とNF- $\kappa$ B阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomycin (DHMEQ)の併用療法について、EBVで形質転換したヒトB細胞 lymphoblastoid cell line (LCL)をモデルに、in vitroおよびin vivoにおける抗腫瘍効果を検討し、その結果、in vitroにおいては抗腫瘍効果の増強が認められたもののin vivoにおいては明らかな増強効果が認められなかった。そこで本年度はスタチンとの併用療法に使用可能な新たな治療標的の探索を目的とした。スタチンは接着因子LFA-1の機能阻害、lipid raftの廃絶によるLMP1シグナルの抑制、DHMEQはNF- $\kappa$ Bそのものの核内移行の抑制によるNF- $\kappa$ B恒常的活性化の抑制が抗腫瘍効果をもたらすと考えられ、どちらも最終的にはNF- $\kappa$ Bを標的としている。そこで今回は、治療標的としてLMP1により活性化するNF- $\kappa$ B以外の転写因子 AP-1, STAT3に着目した。そしてAP1, STAT3の活性化につながるMEK-ERK, JAK-STATの2つの経路を阻害するMEK阻害薬, JAK阻害薬について検討した。

一方で、HAART導入後、本邦ではEBV陰性エイズ関連リンパ腫も増えてきている。これらのリンパ腫の組織型はEBV関連日和見リンパ腫と同様にDLBCLであるが、その発症機構はほとんど知られていない。本分担研究のもう一つの課題はこうした近年のエイズ関連リンパ腫を遺伝子発現プロファイルなどから分子病態ごとに再分類することである。本年度はエイズ関連リンパ腫20例を収集し、そこに含まれるウイルスを検出し、遺伝子発現プロファイル検索の基礎情報とする。

## B. 研究方法

### 1. 細胞培養

EBV感染ヒトB細胞LCL(5種類)、EBV陽性LMP1陰性バーキットリンパ腫細胞株 Raji、EBV陰性バーキットリンパ腫細胞株 BJAB, Ramos は10%牛胎児血清添加 RPMI1640 (抗生

物質添加) 中で37°C 5% CO<sub>2</sub> の培養器にて培養を行った。JAK阻害剤(Calbiochem社 #420097)、MEK阻害剤 U0126 (プロメガ社) はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解後、目的濃度になるように培養上清に加えた。

### 2. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖は Cell Proliferation Kit II (XTT) (ロシュ・ダイアグノスティクス社)により測定した。試薬添加群のコントロール群としてDMSOを同濃度に添加した細胞を用いた。

### 3. 細胞周期分析、アポトーシス誘導の検討

2x10<sup>4</sup>(4)/mlの細胞に試薬添加3日後に70% EtOH固定、PI染色し、DNA量をフローサイトメーター(partec社)で測定さらにFlowJoソフトウェア(Digital Biology社)にて解析を行った。アポトーシス誘導の有無の検討はAnnexin V FITC Apoptosis Detection Kit(BD Bioscience社)を用いて行った。

### 4. NF- $\kappa$ B活性 (EMSA法)

2x10<sup>4</sup>(4)/mlの細胞に試薬添加3日後に核分画抽出を行い、LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (PIERCE 社)を用いて解析を行った。

### 5. エイズ関連リンパ腫20例におけるウイルスの検出

国立感染症研究所感染病理部、および東京都立駒込病院病理科に保存してあるエイズ関連リンパ腫の凍結標本20例につき、EBV, HHV-8, HIV の検索を行った。組織型はすべて diffuse large B cell lymphoma であり、生検、または剖検時に採取し、凍結保存後、DNA・RNA 抽出した。ウイルスの検出はリンパ腫から抽出したDNAを用いて、通法のPCRを行った。EBVはW-region, HHV-8はORF26, HIVはgag領域を標的とした。また、内因性コントロールとしてbeta-globin 遺伝子の増幅を行った。

### (倫理面への配慮)

ヒト由来試料(エイズ関連リンパ腫の凍結標本)の検索に関して、サンプルはすべて匿名化された状態で使用され、研究計画は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会による承認を受けた(承認番号156, 157)。

## C. 研究結果

### 1. エイズ関連リンパ腫における蛋白リン酸化酵素阻害薬の抗腫瘍効果

#### 1) JAK阻害剤、MEK阻害剤によるLCLの増殖に与える効果

JAK阻害剤、MEK阻害剤を2 $\mu$ Mの濃度で添加し4日目に細胞増殖アッセイを行うとLCLの増殖抑制効果が認められた。この抑制効果はEBV陽性LMP1陰性のRajiやEBV陰性LMP1陰性のBJABに対しては効果が認められないか、効果はごくわずかであった。LMP1陰性のリンパ腫細胞株に増殖抑制効果を示すDHMEQと異なり、JAK阻害剤、MEK阻害剤はLMP1陽性のLCLに対して選択的に増殖抑制効果がみられ特異性が高いと考えられた。またこの増殖抑制効果は2-20 $\mu$ Mの濃度で濃度依存的に認められた (図1, 2)。さらに、LCLが増殖するときに認められるクランプ形成について、薬剤添加後4日目に顕微鏡下で観察したところ、スタチンと同様にクランプ形成は認められなかった。(図3)

#### 2) JAK、MEK阻害剤による細胞周期への影響およびアポトーシス誘導

JAK、MEK阻害剤2 $\mu$ Mで3日間処理したLCLではアポトーシスの誘導は明らかではなかった。コントロール群ではG0G1期の細胞は51.8%であったが、MEK阻害剤、JAK阻害剤の添加によりそれぞれ60.1%, 52.9%とG0G1期の細胞が増加した。アポトーシスを誘導するスタチンと

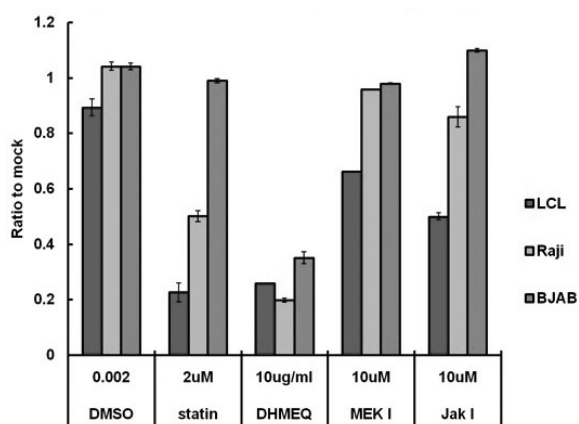


図1 JAK阻害剤、MEK阻害剤添加3日後のXTT assayによる細胞数の解析結果を示す。ともにLCLの増殖を抑制する。スタチン、DHMEQと比較してLMP1陽性のLCLに対して特異性が高いと考えられる。

### Cell proliferation assay (XTT assay), Day 4

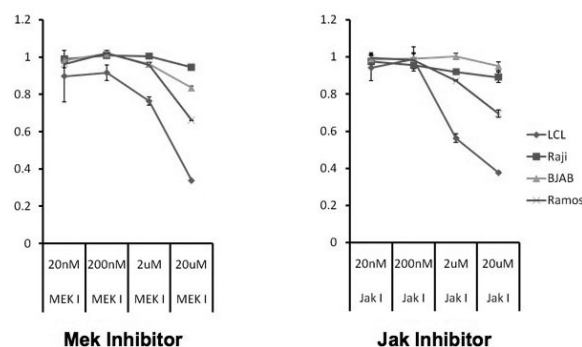


図2 JAK阻害剤、MEK阻害剤ともに2-20 $\mu$ Mの濃度で濃度依存的にLCLの増殖を抑制した。

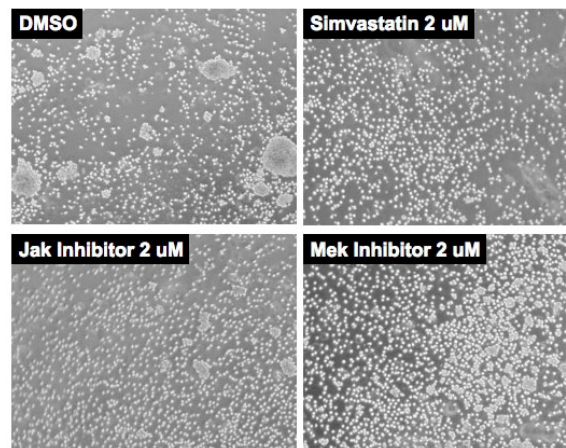


図3 JAK阻害剤、MEK阻害剤ともにLCL増殖の際に認められるクランプの形成が消失した。

は異なる機序で増殖抑制がおこっていると考えられた。

#### 3) JAK、MEK阻害剤によるNF- $\kappa$ B活性の変化

LCLの増殖にはNF- $\kappa$ Bの構成的活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。JAK阻害剤、MEK阻害剤添加群のNF- $\kappa$ B活性をEMSA法にて検討したところ、JAK阻害剤では変化が見られなかったが、MEKを20 $\mu$ M加えた群で活性低下が認められた (図4)。これはJAK阻害剤はNF- $\kappa$ Bの活性化を阻害せず、NF- $\kappa$ Bとは異なる経路を標的としていることを示している。



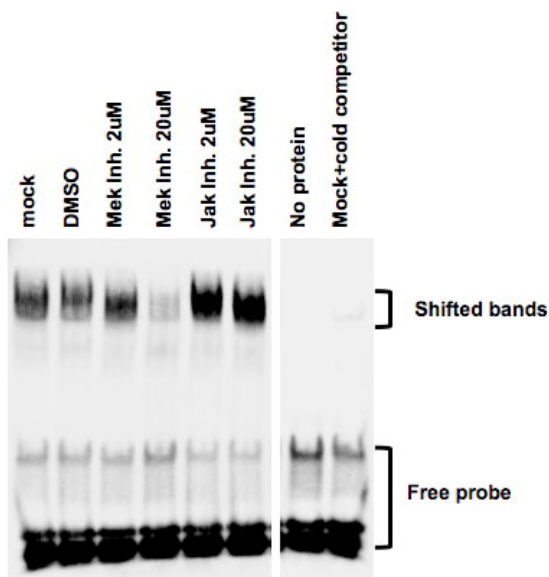


図4 MEK 阻害剤 20  $\mu$  M で NF- $\kappa$ B の活性が抑制されたが、JAK 阻害剤の影響は明らかではなかった。

## 2. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイル（ウイルス）の検索

日本人エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイルを明らかにする目的でエイズ関連リンパ腫サンプル 20 例を収集した。このサンプルにつき、これまでエイズ関連リンパ腫との関連が明らかにされているEBV, HHV-8、およびHIVにつき、conventional PCRで検出を試みた。結果、EBVは20例中18例に検出され、一方でHHV-8の検出されるサンプルはなかった（図5）。HIVはDNA PCRで20例中6例に検出された。EBVのウイルス量は1細胞当たり1コピー以上のサンプルが12例であり、残り6例は1細胞当たり0.1コピー以下であった。HIVは多くの症例で1細胞当たり0.01コピー以下と低コピー数であったが、1例のみに1細胞当たり3コピー程度の高いコピー数が検出された。この症例ではHIVのインテグレーションが疑われた。

## D. 考察

EBV 陽性のエイズ関連日和見リンパ腫はLMP1 によるさまざまなシグナルの活性化が形質転換に関わっている。なかでも NF- $\kappa$ B の恒常的活性化がもっとも重要と考えられている。DHMEQ は NF- $\kappa$ B を直接の標的としており、ス

タチンと DHMEQ の併用を検討した昨年度の本研究では、併用による増強効果が明らかではなかった。LCL に対するスタチンの効果は接着因子の機能阻害と lipid raft 上の LMP-1 の 3 量体形成を阻害し、LMP-1 のシグナル伝達そのものを阻止するところにある。今回我々はスタチンとの併用療法を念頭に置き、LMP1 による形質転換に関わる主な転写因子 NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT3 のうち NF- $\kappa$ B 以外の AP-1 の活性化につながる MEK/MAPK の経路、STAT3 の活性化につながる JAK3/STAT3 の経路をブロックする MEK 阻害薬、JAK 阻害薬の効果について検討した。

JAK 阻害薬、MEK 阻害薬ともに LCL の増殖抑制効果を認めたが、スタチン、DHMEQ などこれまでに効果が確認された薬剤に比べて影響は弱い。とくに JAK 阻害薬については IC<sub>50</sub> が 1-20nM であることを考えると 2-20 $\mu$ M での効果はかなり投薬強度が強い状況での影響をみていることとなる。今回使用した JAK 阻害薬は JAK1, 2, 3, Tyk2 を阻害することがわかっているが、それ以外にも多くの蛋白リン酸化酵素の活性を数百 nM の濃度で阻害することがわかっている。今後より特異性の高い薬剤を使用し詳細に標的となる蛋白リン酸化酵素を絞り込む必要があると考えられる。一方で JAK 阻害薬による NF- $\kappa$ B 活性の抑制効果が見られなかったことから、NF- $\kappa$ B を標的とするスタチンなどの薬剤との併用では増強効果が期待できる。また LMP1 陽性細胞に特異性が高いことからエイズ関連 EBV 感染日和見リンパ腫の新たな治療薬として有力な候補になるかもしれない。一方で MEK 阻害薬は JAK 阻害薬に比べてやや効

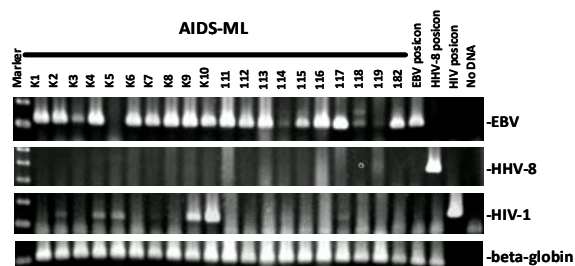


図5 エイズ関連リンパ腫 20 例における EBV, HHV-8, HIV の検出。

果が弱く、20 $\mu$ M では NF- $\kappa$ B 活性の抑制が認められたのでスタチンとの併用を考える上では注意を要する。これまで LCL を用いて日和見腫瘍の治療薬として開発されてきたものは NF- $\kappa$ B の活性阻害を目指したものが多い。今回われわれが使用した MEK 阻害薬と JAK 阻害薬は LMP1 陽性細胞に特異性が高い点では有望で、今後、より詳細に標的を絞り込んでいくことで新たな治療薬の開発につながると考えられる。

近年のエイズ関連リンパ腫の分子病態を明らかにするためには、いくつかの複合的手段を駆使する必要がある。EBV 陽性リンパ腫はいまだに半数を占め、これらは EBV による日和見リンパ腫として分類することができる。問題は EBV 陰性リンパ腫であり、これらは共通の遺伝子異常や染色体転座などを持たない。一般に、EBV, HHV-8 以外のウイルスが直接的にリンパ腫発症と関連する可能性は低い。今回、EBV は 2 例で陰性であったが、PCR は感度が高いため、病因と関連しない、by standing なウイルスを検出している可能性もある。また、組織学的には EBER の in situ hybridization が EBV の検出には信頼のある手法とされるが、PCR の結果とは合致しない症例も存在した。EBV の PCR の結果は強いバンドと弱いバンドが混在しており、EBV 量が一定ではないことが伺える。定量的 PCR では 1 細胞当たりのコピー数が 1 を越えている症例は 12 例に過ぎず、8 例は EBV 陰性、または低コピー数であり、病態と関連していない可能性がある。今後、EBV コピー数により、遺伝子発現プロファイルが変化するかどうか、検討が必要である。HIV 陽性のリンパ腫はきわめて珍しく、以前我々が報告した例では HIV が Stat3 遺伝子上流にインテグレーションし、stat3 遺伝子発現の亢進を誘導し、リンパ腫発症に関連していた。今回の検索でも 1 例に高コピー数の HIV が検出されており、今後の解析対象としたい。

## E. 結論

1. LMP1 を標的とし、JAK および MEK 阻害薬が、LCL を 2-20  $\mu$ M の濃度で増殖を抑制することを見いだした。LMP-1 の発現細胞特異的に増殖効果が見られ、これらの阻害薬はエイズ関連

EBV 感染日和見リンパ腫の新たな治療薬の候補であると考えられた。

2. エイズ関連リンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析のため、エイズ関連リンパ腫サンプル 20 例を収集し、基礎情報として、EBV, HIV, HHV-8 などのウイルスを検出した。その結果、すくなくとも 2 例の EBV 陰性リンパ腫が含まれていることが分かった。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Dewan, MZ, Takamatsu, N, Hidaka, T, Hatakeyama, K, Nakahata, S, Fujisawa, J, Katano, H, Yamamoto, N, Morishita, K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. J Virol. 82:11958-11963, 2008.
- 2) Dewan, MZ, Tomita, M, Katano, H, Yamamoto, N, Ahmed, S, Yamamoto, M, Sata, T, Mori, N, Yamamoto, N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. Int J Cancer. 124: 622-629, 2009.

### 2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 片野晴隆、菅野隆行、佐多徹太郎. 定量的 PCR による網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイル 第 97 回日本病理学会総会 2008.4 金沢
- 2) 菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆. RTA 発現レベルの異なる KSHV 感染細胞におけるウイルス感染維持 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月、岡山.
- 3) 片野晴隆、加納基史、中村智之、菅野隆行、浅沼秀樹、佐多徹太郎. 定量的 PCR による網羅的ウイルス検出法の開発とエイズ剖検例の各臓器におけるウイルス感染プロファイ



ルの解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月、岡山.

- 4) 片野晴隆、中村智之、菅野隆行、佐藤由子、佐多徹太郎. KSHV 感染における KSHV 全遺伝子発現プロファイルの解析. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 11 月、岡山.
- 5) 片野晴隆、佐多徹太郎. エイズ関連リンパ腫およびエイズ剖検例の各臓器における多種類ウイルスの定量. 第 22 回日本エイズ学会学術集会 2008 年 12 月、大阪.

#### **H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）**

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし

## B 細胞腫瘍化の主因である EBV を標的にした治療法開発

分担研究者 駒野 淳国立感染症研究所 エイズ研究センター 主任研究官

**研究要旨** 悪性リンパ腫はエイズに伴う悪性腫瘍としては日本で最も多く、エイズ発症の初発疾患として顕れることもあり、治療が最も困難なエイズ関連疾患である。日本人におけるリンパ腫治療は未だ研究的な段階であり、その病因を同定し最適な治療法を確立することはエイズの予後を決定する重要なファクターとなる。エイズリンパ腫が予防できれば HIV-1 感染者の予後/QOL を大きく改善できる。そこで、本研究ではエイズリンパ腫のうちその多くの割合を占める EBV 陽性の B 細胞性リンパ腫に着目した。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫では特異的治療標的分子として EBV 潜伏感染関連核抗原 EBNA1 が指摘されているが、その分子標的候補としての評価は依然確立していない。本研究により EBNA1 阻害により B 細胞不死化関連ウイルス抗原発現が抑制され、エイズに合併する EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫の発生が抑止できる可能性が示唆された。EBV 陽性 B 細胞性リンパ腫予防の分子標的としての EBNA1 の評価を確立できたことをうけて、dominant-negative EBNA1 mimicking inhibitor の開発が期待される。

### A. 研究目的

悪性リンパ腫はエイズに伴う悪性腫瘍としては日本で最も多く、エイズ発症の初発疾患として顕れることもあり、治療が最も困難なエイズ関連疾患である。しかし、リンパ腫治療は未だ研究的な段階であり、その病因を同定し特異的治療法を確立することはエイズの予後を決定する重要なファクターとなる。エイズリンパ腫のうち、EBV 陽性の B 細胞リンパ腫はその多くの割合を占めており、リンパ腫の原因が EBV の存在に依存することが明らかである点において他のリンパ腫と異なる。Epstein-Barr virus(EBV)は多くの成人が感染しているヒトヘルペスウイルスである。また、EBV はバーキットリンパ腫や上皮性腫瘍といった、多くのヒト細胞の腫瘍化に関連するとされている。現在

EBV 陽性の B 細胞リンパ腫には特異的な治療標的分子として EBV タンパク質の存在が指摘されている。その治療標的としての重要性は近年指摘されているにもかかわらず、予防の分子標的候補としての評価には依然確立していない。

EBV の B 細胞への感染は吸着、脱殻が起こり、ウイルスゲノムは核へと移行する。EBV ゲノムの両端には末端反復配列 (Terminal Repeat : TR) が存在し、細胞の核に侵入するとこの領域を介して環状化する。EBV ゲノムには潜伏感染時の複製起点として *oriP* がコードされており、宿主ゲノムと同期して複製し、娘細胞へと分配されて維持される。EBV ゲノムからは核抗原の EBNA2 と EBNA-LP が最初に発現する。転写活性化因子の EBNA2 は宿主の遺伝子の発現をトランスに増強して細胞を増殖させると同時に、

EBV ゲノム上の EBNA2 responsive element に結合して C プロモーターからのウイルス遺伝子の発現を増強する。これによって他の EBNA とともに EBNA1 が発現する。EBNA1 は *oriP* に結合して、EBV ゲノムの複製と C / W プロモーター (C / W<sub>p</sub>) を活性化する。これにより更に EBNA が発現する。加えて潜伏感染膜タンパク質 (Latent membrane protein : LMP-1 / -2) の発現も活性化される。EBER も感染細胞中に大量に発現し、増殖因子の自己分泌の誘導等を介して B 細胞の悪性形質維持に関与している。以上のメカニズムによって、EBV は B 細胞を悪性形質転換しその形質を維持する。

EBV による発ガン活性を阻害するために、現在までに EBNA2、EBNA1、LMP-1 を創薬標的として研究が行われてきた。EBNA1 は EBV ゲノムの複製・維持とウイルス遺伝子転写の活性化という B 細胞の悪性化に関わる重要なタンパク質であるため、我々は創薬標的として特に注目している。EBV ゲノムの複製とウイルス遺伝子の転写の活性化は、*oriP* を構成する family of repeat (FR) と dyad symmetry element (DS) の EBNA1 binding site (EBNA1 BS) へ EBNA1 が結合することによって起こる。EBNA1 BS は FR に 20、DS に 4 ヶ所存在する。DS への EBNA1 が結合することにより、EBV ゲノムの複製が促進する。また EBNA1 が *oriP* に結合すると、エンハンサー機能が活性化する。それにより C / W<sub>p</sub> が活性化して、ウイルス遺伝子の転写が増強する。加えて EBNA1 は EBV ゲノムと宿主ゲノムを結合させることによって、EBV ゲノムを効率的に娘細胞へ分配させる。

現在までに、EBNA1 の核移行シグナルと二量体化ドメイン以外を欠失させた EBNA1 変異体である dominant-negative EBNA1(DNE1)を発

現させることによって、EBV が感染した B リンパ腫細胞や上皮系腫瘍細胞株から EBV のゲノムを脱落させ、悪性増殖形質を低下させることが報告されている (Kennedy et al, PNAS 2003; Nasimuzzaman, et al Mol Therapy 2005)。しかしリンパ腫の治療・予防のための分子標的候補評価において、ウイルスの感染を防止するための分子標的であるかどうかは依然検索されていない。本研究は EBNA1 の阻害剤として DNE1 を使用し、DNE1 発現細胞が EBV 感染に対する抵抗性を獲得できるかを評価することを目的として、これを通じて EBNA1 に対する治療・予防のための分子標的候補としての評価を行い、新たな原因特異的リンパ腫治療および予防法開発に資することを目的とする。

## B. 研究方法

(1) DNE1 発現ベクターの構築: DNE1 を GFP との融合タンパク質として発現するレトロウイルスベクター pCMMP GFP DNE1(GD) を構築した。DNE1 は Kennedy et al, PNAS 2003 に記載されているものを使用した。これは nuclear localization signal および dimerization and DNA binding domain のみを有するアミノ酸 377-391(NLS) から 451-641(DNA binding and dimerization domain) までは GFP の N 末端側に融合させるように構築したものである。pCMMP は CMV と MLV LTR の融合プロモーターから遺伝子発現を誘導する哺乳類細胞遺伝子発現ベクターでもあり、遺伝子の発現と機能解析も本ベクターにて行った。また陰性コントロールとして GFP のみを発現する pCMMP GFP を使用した (Komano et al., Mol Biol Cell 2004)。EBNA1 依存的転写を抑制するかについては、EBNA1 依存的プロモーターにて luciferase を発現する FR-tk-Luc と EBNA1 を 293T 細胞へ

cotransfectionすると同時にGDまたはGFP発現ベクターを導入して転写レベルの減少をluciferase活性にて測定した。特異性を検討するためにCMVプロモーターによりluciferaseを発現するベクターを使用した。

(2) レトロウイルスベクターによるDNE1発現ユニットのtransduction : pCMMP,pVSV-G,pMDgag-polを同時に293T細胞にトランスフェクションして2日後に培養上清を回収して0.45umでfilterしたものをウイルス液とした。ウイルス液にはpolybreneを添加した。これをB cell acute lymphocytic leukemiaであるEBV陰性細胞株B-ALLに感染させた。B-ALL細胞を $0.5-1.0 \times 10^5$ 個準備しこれにウイルス液1 mlにresuspendして4°Cで1時間rotateし細胞にウイルスを吸着させた後、培養液に置換して培養を続けた。Gene transductionはGFP蛍光により検出し、GFP陽性細胞をsortingし、細胞増殖、形態等に関する基礎的検討を行った。

(3) DNE1発現細胞に対するEBV感染とEBV遺伝子発現およびゲノム維持に関する検討 : GDまたはGFPを導入したB-ALL細胞に対しEBV B95-8株をpolybreneを欠く条件下でMLVと同様のprotocolにて感染させた。感染後およそ2週間にわたってウイルス遺伝子発現およびウイルスゲノム維持に関する検討をPCRにて行った。ウイルスの細胞への吸着は感染後3回細胞を培養液で洗浄した細胞由来のウイルスゲノム量にて、感染後のウイルスゲノム核内移行は感染後1日目の核内DNA中におけるウイルスゲノム量をBamHI W fragmentに対するPCR primerを用いてそれぞれquantitative PCRにて定量した。これはcellular genomic DNA重量あたりのEBV genome W断片検出量をコピー数としてあらわした。また、感染細胞における

ウイルス遺伝子発現は細胞のtotal RNAを使用したend point semi-quantitative RT-PCRおよびquantitative RT-PCRにて検討した。EBER1とLMP-2Aのprimerは過去に記載されたものを使用し、そのreferenceはBrooks et al., J Virol 1993; Miller et al., J Virol 1993; Busson et al., J Gen Virol 1995; Bell et al., J Gen Virol 2006である。C/W promoterからの転写産物はW1/W2 exonを標的にしたprimerを使用し、その配列は以下の通りである : 5'-ccctcggacagctcctaag-3', 5'-cttcacttcggtctccccta-3'。PCRの特異性はvirus非感染B-ALLでampliconが増幅されない事、EBV-immortalized B-LCLでampliconが増幅されること、ampliconの核酸配列により検証した。(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

### C. 研究結果

(1) DNE1発現ベクターpcmmp GDの構築 : Luciferase assayの結果、EBNA1の発現によりルシフェラーゼ活性は約12倍に増加した。これに加えてGDを共発現させると、プラスミド量依存的にルシフェラーゼ活性が低下した。一方、pcmmp GDのかわりにpcmmp GFPを、FR-TK-LuciferaseのかわりにCMV Luciferaseを使用しても同様の現象を認めなかった。以上より我々の作製したGDにdominant-negative EBNA1の活性があることが確認できた。(図1)。

(2) レトロウイルスベクターによるDNE1発現ユニットのtransduction : BALL細胞にウイルスを感染後2-3日後にGFP陽性細胞が現れ、その割合はおおよそ20-50%であった。100%陽性の細胞集団を得るため、FACS sortingによりGFP陽性細胞をbulk collectionした。GFP蛍光レベルが高いものと低いものを収集し相互に比較した。これらの細胞におけるGFPおよび

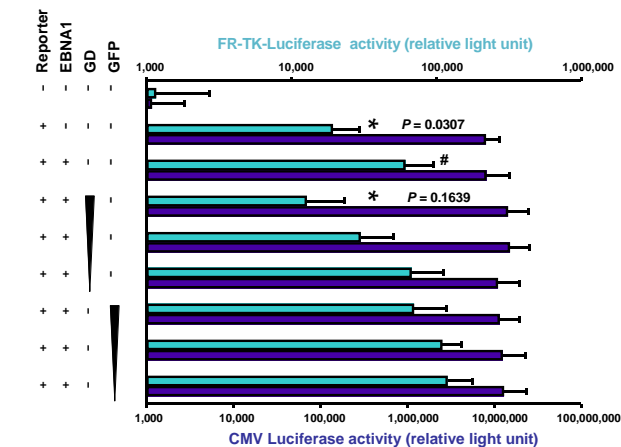


Fig. 1 293FT細胞への一過性トランスフェクションによる GDのdnE1活性

GDの発現は293Tと同様にWestern blottingにて確認された。細胞増殖および細胞形態はGFP, GD発現により明らかな違いを呈することはなかった。GDは核移行シグナルによって主として核に局在したが、GFPは細胞質と核に均一に存在した。GDはEBNA蛍光補体法でも核内に点状シグナルとして検出された。

(3)DNE1発現細胞に対するEBV感染とEBV遺伝子発現およびゲノム維持に関する検討：増殖速度のほぼ同じB-ALLのGFP, GD細胞を使用してEBV感染に対するGDの影響について検索した。EBV感染に対するGDの影響を解析するために、EBV感染から15時間後までのウイルス挙動を、感染後細胞に吸着したEBVゲノム量と感染後15時間後に細胞の核内に到達したEBVゲノム量を比較することにより解析した。EBVゲノム量はBamHI W repeatを標的とするReal-Time PCRにて定量した。この標的は1ゲノム中に約10コピー反復しているため、検出効率を高くすることが出来る。GD細胞ではGD発現量の違いに関らず核移行ウイルスゲノム量は漸減し、その効率はそれぞれ47-66%と58-68%とほぼ同程度であった。ウイルスゲノム量減少率は感染後から一定で、GFPとGD発現細胞間でもGD発現レベルが異なる細胞間でも有意な差を認めなかった(図2)。GDによるEBVゲノム脱落効率に対する影響を

解析するため、上記に加えてEBV感染直後から2週間後までの細胞内ウイルスゲノム量の推移を同様に解析した。GD細胞ではGDの発現量の違いに関らずEBVゲノム量は細胞分裂1回あたり約10-16%の比率で漸減し、その程度はGFP発現細胞とほぼ同程度であった。2回の独立したB-ALL細胞とBJAB細胞へのEBV感染実験で同様の結果を得た。以上よりB細胞でのEBVゲノム脱落効率は約10-16%であり、

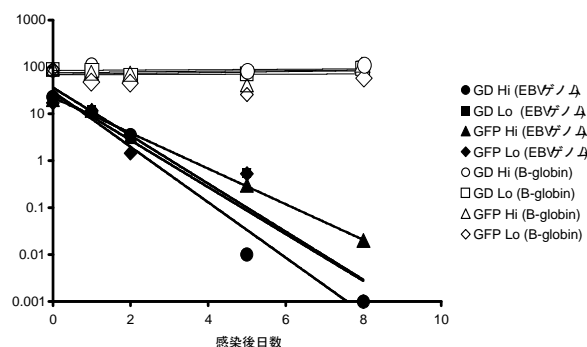


Fig. 2 GD/GFP細胞におけるEBVゲノムの核内移行効率とゲノム維持効率

GD発現はEBVゲノム脱落効率に影響しないことが判明した。なお、感染後は細胞をアシクロビルを含むメEDIUMで培養して溶解感染細胞を除いているため、検出されたEBVゲノム量は潜伏感染細胞のみを反映している。GDによるEBV遺伝子転写に対する影響を解析するため、EBV感染から2日後の細胞におけるEBV遺伝子産物としてC/Wp由来転写産物、LMP2AのmRNA、EBER1 RNAについてReal-Time RT-PCRにて解析した。C/Wp由来転写産物はB細胞の悪性形質転換・維持を担うEBV遺伝子EBNA1/2/3をコードする。検出効率を上げるため、mRNA内の反復配列W1とW2エクソンを標的とした。C/Wp由来転写産物はGFP細胞で検出されたが、GD細胞では検出限界以下であった。EBER1の発現はGFP, GD両方の細胞にほぼ同程度検出された。LMP2Aの発現は

全ての細胞で検出限界以下であった（図3）。2回の独立した B-ALL 細胞への EBV 感染実験で同様の結果を得た。以上より GD は EBV ゲノムからの C / Wp 由来の転写を特異的に抑制することが判明した。

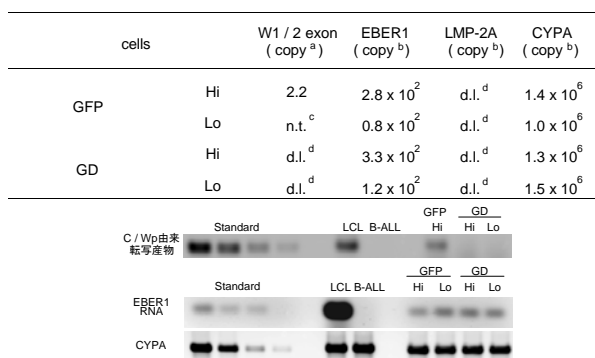


Fig. 3 GDによる各遺伝子の転写効率 への影響とアンブリコンの電気泳動像  
GD / GFP細胞のRNAに対して各プライマーを用いて Real-Time RT-PCRを行い、1反応あたりに検出されたコピー数を示した。1反応あたりの RNAのテンプレート量は、a : 13-14 ng、b : 200 ngを用いた。c は未実験、d は検出限界以下を示す。

## D. 考察

EBV感染に対するdnE1の活性をB細胞において評価したのは、我々が初めてである。Sugdenらが行ったように、上皮系細胞での一過性トランスフェクションにおいてdnE1は *oriP* プラスミドの脱落を促進する活性を示す。ところが、GDはB-ALL細胞とBJAB細胞において、感染でもたらされるEBVゲノムの脱落を促進することは出来なかった。一方、GD によるEBVゲノムからのEBNA 1 依存的転写抑制は観察された（LAST FIGURE）。これと同様の転写抑制がdnE1を発現させたEBV陽性リンパ腫細胞においても観察されている。以上の結果より、GDはEBVゲノムの複製・維持よりも転写に対してより大きな影響を与えると考えられる。

GDの転写とEBVゲノム複製への影響：EBVゲノムの複製と転写へのGDの作用は、ともに *oriP* へのEBNA1結合阻害に由来する。それにも関わらず転写への影響が大きく検出され

たのは、(1) EBVゲノムの複製・維持に比べて転写促進はEBNA1をより多く必要とする可能性と、(2) 感染直後のEBVゲノムの複製・維持は、樹立されたEBV潜伏感染細胞よりもEBNA1依存度が低い可能性が考えられる。

(1)の可能性はKennedyらがEBV陽性B細胞腫瘍株でdnE1効果を解析した際にも同様に指摘されている。Wysokenskiらは *oriP* プラスミドを用いて転写とEBVゲノムの複製・維持におけるEBNA1 BSの必要数をEBV陽性細胞株であるRaji細胞において解析した。その結果、転写に必要なEBNA1 BSの数はEBV DNAの複製・維持より多かったと報告している。これはGDの効果が転写でのみ観察できた我々のデータとよく合致する。(2)の可能性はLeightらの報告によって裏付けられる。彼らはEBVゲノムのモデルとして *oriP* プラスミド (約10kbp) を使用して、安定した *oriP* プラスミド保持細胞からのプラスミド脱落効率は細胞周期ごとに約4 % であると報告している。我々の実験からEBVを感染させたB細胞からの脱落効率は約10-16 % であり、上記の2.5-4倍である。これは安定なEBNA1 / *oriP* 依存的EBVゲノム複製は感染後すぐには確立できず、EBNA1 / *oriP* システムが感染直後に十分に機能していないことを示唆している。一方、Leightらによると、トランスフェクションによって一過性に *oriP* プラスミドを導入した上皮細胞からは、プラスミド脱落効率は細胞周期ごとに25 % 以上であった。我々の実験からEBVを感染させたB細胞からの脱落効率はこの約半分であった。これは、*oriP* プラスミド複製・維持効率は上皮細胞系での一過性導入実験とB細胞でのEBV感染系では質的に異なることを示唆する。EBVはプラスミドと異なり、EBNA1 / *oriP* システム非

依存的に複製できる。例えばRaji細胞に感染するEBVの複製がoriPに非依存性であることが報告されている。また、Heinzelらは長いDNA断片は多くの複製起点を供与しDSを機能的に肩代わりしやすいことを報告している。さらに、B細胞ではEBVゲノムの複製効率が高い、もしくはEBVゲノムの娘細胞への分配効率が高い可能性も否定できない。現在これを直接的に支持する報告はない。しかし、EBNA1がEBVゲノムの複製・維持に機能を発揮するために宿主因子を必要とすることは明らかであるため、宿主因子の存在比率等の影響によりB細胞ではEBVゲノム複製効率や娘細胞への分配効率が特徴的な振る舞いをするのかもしれない。これらのデータはEBVゲノムがEBNA1非依存的な複製・維持しやすいことを示しており、より自然に近い状態を再現したEBV感染実験によって得られたデータはoriPプラスミドを利用した既報がどのようなファクターによって影響をうけるかを示唆する重要な知見であると考えられる。以上をまとめると、おそらく本実験系では(1) - (2) のどちらかもしくは両方の可能性の影響があったと推測される。(1)を検証するためには、EBVに潜伏感染したGD / GFP細胞からEBVゲノム - EBNA1複合体を抽出し、実際にEBNA1 BSに結合しているEBNA1数を定量する必要がある。(2)を検証するためには、EBV感染細胞からEBVゲノムを回収し、2次元電気泳動 / サザンブロット法による複製起点の検索を行う必要がある。細胞種特異的なEBVゲノム挙動を検証するためには、宿主因子の存在比率の違うB細胞同士や他細胞種などでEBV感染後のウイルスゲノムの挙動を解析する必要がある。EBV持続感染予防効果について:安定したoriP

レプリコンの樹立は、プラスミドを導入された細胞の数 %しか達成できないことが一過性のトランスフェクションで示されている。これをestablishment効率と呼ぶ。Leightらによると、上皮系細胞へのoriPプラスミド導入実験では、establishment効率は約1-10 %程度であると報告されている。この現象はB細胞株にEBVを感染させたときにも同様に観察される。このestablishment効率をGDが低下させるのであれば、GDは悪性形質関連EBV遺伝子発現を阻止するだけでなく、EBV持続感染も阻止できると結論できる。

EBV関連リンパ腫予防薬開発の分子標的としてのEBNA1 : EBVは多くの予後不良の疾患の原因として知られている。多くの成人では不顕性かつ慢性的に感染するものの悪性疾患

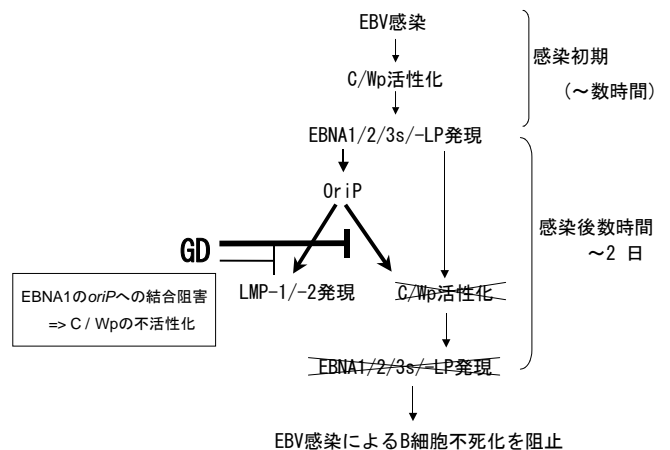


Fig. 4 Dominant-negative EBNA1作用機序モデル

EBNA1機能障害がEBV関連リンパ腫およびEBV関連疾患の予防分子標的となり得ることが世界で始めて実証された(図4)。これを実用化するためには、dnE1と同様の機能をもつ小分子化合物をスクリーニングし、EBNA1阻害剤を得ることが必要である。EBNA1のタンパク質主体構造はX線回析により既に同定されている。これを基にEBNA1核酸結合を阻害する化合物か、EBNA1の2量体を阻害する化

化合物をデザインし、EBVによるV細胞不死化抑制能力および不死化したB細胞増殖抑制能力を評価すればよい。このような化合物が dominant negative EBNA1 "mimic"として作用させる際に細胞生理学的副作用の懸念は低いことが本研究であわせて示された。

実際、EBNA1阻害剤が開発できたとしたら、どのように使用するのが最も効果的だろうか？予防のため長期間にわたり服薬するのは費用対効果が悪く、現実的ではない。予防的投薬にはPTLDと死因の上位を占めるエイズリンパ腫の予防が最も効果的と思われる。PTLDなどでは免疫抑制剤から離脱できない期間に限定的に免疫抑制剤と併用することが現実的だと思われる。実際には移植前の免疫抑制剤開始以前からレシピエントに予防的投与を行うのが効果的であろう。エイズリンパ腫を予防するためには、エイズ患者が多剤併用療法 (High Active Anti-Retroviral Therapy : HAART)と共に常にEBNA1阻害剤を服用することが实际的と考えられる。EBNA1阻害剤はEBV関連疾患の治療にも応用できるため、治療用として使用するのはもちろん可能である。一剤で予防と治療の2つの効果を持つ優れた薬剤となることが期待できる。

現在エイズリンパ腫における日本人の最適化に化学療法が確立していない。また、その予防方法も存在しない。しかし、リスクファクターが明らかなリンパ腫はEBV陽性B細胞性腫瘍である。エイズに合併するリンパ腫の約半数がEBV陽性B細胞リンパ腫であることから、EBNA1 "mimic"の有用性は高いと思われる。今後はヒト化マウスにおける dominant-negative EBNA1 によるEBV感染の抑止について検討していきたい。

## E. 結論

本研究により、エイズリンパ腫の治療と予防のためにEBVのEBNA1は治療標的になることが判明した。我々の使用した dominant negative EBNA1 と同様の作用機序を持つ小分子化合物を創成することにより、EBV関連Bリンパ腫予防・治療薬に使用できると思われる。EBNA1の機能阻害がリンパ腫の発生を予防するための良い分子標的足りえることが示唆された。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

論文発表

- 1) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. J Med Chem (in press)
- 2) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. FEBS Let (in press)
- 3) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. Cancer Sci (in press)
- 4) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human



immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production. J Gen Virol (in press)

5) Emiko Urano, Saki Shimizu, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Naoko Takahashi, Hidesuke Fukazawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/P-TEFb-dependent LTR transcription. AIDS. May 31; 22(9):1081-3, 2008.

6) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Kei Sato, Yoshiharu Miura, Yoshinori Ando, Jun Aoki, Jun Komano, Yuetsu Tanaka, Yoshio Koyanagi. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. Traffic. Apr; 9(4):540-58 2008.

#### 1. 学会発表

(国際学会)

1) Takeshi Yoshida, Yuji Kawano, Yoshinori Ando, Kei Sato, Jun Komano, Yuetsu Tanaka and Yoshio Koyanagi. A CD63 MUTANT INHIBITS CXCR4 TRAFFICKING TO THE PLASMA MEMBRANE AND BLOCKS X4 HIV-1 ENTRY. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

2) Emiko Urano, Yuki Kariya, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Yuko Morikawa, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, and Jun Komano. Identification of the carboxy-terminal domain of bromodomain containing 4 as a specific silencer of HIV-1 replication. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

3) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto and Jun Komano.

FUNCTIONAL SUBSTITUTION OF THE MYRISTOYLATION SIGNAL OF HIV-1 GAG WITH PHOSPHOLIPASE C DELTA 1 PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN. CSH Meeting on Retroviruses, May 18-24, 2008, Cold Spring Harbor, NY

(国内学会)

1) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008 年、兵庫

2) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008 年、兵庫

3) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity Awaji 2008, 2008 年、兵庫

4) 浦野 恵美子,奥長浩之、森川裕子、駒野 淳. DNA J/HSP40 Co-chaperone familyによるHIV-1複製抑制. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年、岡山

5) 駒野 淳、浦野 恵美子、刈屋 祐美、二橋 悠子、市川 玲子、濱武 牧子、深觸 秀輔、森川 裕子、芳田 剛、小柳 義夫、山本直樹. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C末端ドメインの同定とその機能解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年、岡山

6) 駒野 淳、濱武 牧子、青木 徹、浦野 恵美子、二橋 悠子、山本 直樹. BiFC/BRETによる癌転移増強分子CXCR4のLigand非依存的な多量体形成の解析.第67回日本癌学会学術総会、2008,名古屋

7) 村上 努、大隈 和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野 淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹. KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪

8) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺嶋一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. HIV-1 Pre55Gagのミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪

9) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、古田 篤司、田中礼子、山本直樹、田中勇悦.宿主由来タンパクOX40L,OX40のHIV-1感染に与える影響. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪

10) 浦野 恵美子,奥長浩之、森川裕子、山本直樹、駒野 淳.Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第22

回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪

11) 小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫. レンチウイルスバクターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪

12) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET .BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸

13) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity .BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸

14) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



## EB ウイルスによるリンパ腫発症モデルの開発

分担研究者 藤原成悦 国立成育医療センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 エイズリンパ腫の主原因となる EB ウイルス (EBV) の感染モデルマウスを作製し、リンパ腫発症メカニズムの解析と治療法を開発を進めている。本年度は、モデルマウスの不顕性 EBV 持続感染について解析した。その結果、持続感染状態のマウスでは、EBV がやや大型の芽球様 B 細胞に感染すること、少なくとも一部の細胞は EBNA1, EBNA2, LMP1 を発現する latency III 型 EBV 遺伝子発現を示すことから、ヒトにおける EBV 潜伏感染とは異なる側面があることが示唆された。一方、EBV 感染後に OKT3 抗体投与により T 細胞を除去すると、マウスの生存期間が短縮されることから、マウスモデルに誘導される T 細胞免疫応答が防御的な役割を果たすことが示された。

### A. 研究目的

エイズ患者に発生するリンパ腫（エイズリンパ腫）の約半数は、EB ウイルス (EBV) が原因となる。EBV は *in vitro* でヒト B リンパ球を不死化しリンパ芽球様細胞株を樹立する能力を持つ。このリンパ芽球様細胞に相当する細胞は健常者においては、EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞により速やかに除去されるが、エイズ患者では免疫監視機構破綻のため無制限に増殖し、時にリンパ腫発症に至る。従って、EBV によるヒト B リンパ球増殖の誘発機構解明はエイズリンパ腫発症機構の解明および治療法開発に必須のステップとなる。また、個体レベルでのリンパ腫発症機構の解析や新規治療法の評価には動物モデルが必要である。EBV 関連リンパ腫の小動物モデルとしては従来 *scid* マウスが用いられてきたが、このマウスではウイルス特異的免疫応答が誘導されないことが欠点であった。

NOD/Shi-*scid*/IL-2R  $\gamma$  <sup>c<sup>null</sup></sup> マウス (NOG マウス) は我が国で最近開発された免疫不全マウスであり、造血幹細胞の移植により、EBV の主な標的となる B 細胞の他、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞など主要な免疫系細胞の発生が認められる (ヒト化マウス)。これまでの我々の研究により、ヒト化 NOG マウスには EBV が感染し、EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることが示されている。主に高レベルの EBV 感染によりリンパ腫が発生すること、低レベルの感染では、約半数のマウスがリンパ腫を発症せず不顕性持続感染となり長期生存することが分かっている。ヒトの EBV 関連エイズリンパ腫では、まず EBV が潜伏感染を確立したのちに HIV-1 が感染し、免疫不全の進行とともにリンパ腫を発症するという経過をとる。従って、マウスの持続感染状態をヒト健常者の EBV 潜伏感染と同等のものと仮定すれば、持続感染マウスに HIV-1

を感染させ免疫不全を誘導すればEBV陽性リンパ腫が発生すると推測され、それがエイズリンパ腫モデルとして最適であると考えられる。

本年は、EBV持続感染状態のマウスについて、感染細胞の同定とEBV遺伝子発現の解析を行った。また、感染ヒト化マウスからT細胞を除去する実験を行い、T細胞の防御的役割について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 臍帯血

東京臍帯血バンクに提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できないものを利用した。

### 2. NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$ c<sup>null</sup>マウス

NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$ c<sup>null</sup>マウス（以下、NOGマウス）はNOD/Shi-scidマウスと、IL-2受容体コモン $\gamma$ 鎖ノックアウトマウスを掛け合わせたもので、ヒト造血幹細胞の移植に最も適した免疫不全マウスの一つである。雌6~8週齢のNOGマウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育・実験を行った。

### 3. 臍帯血造血幹細胞の分離と移植

臍帯血からFicoll比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34<sup>+</sup>アイソレーションキット（Miltenyi Biotec）あるいはStemsepキット（ステムセルテクノロジー社）を用いてCD34陽性HSCを分離した。1×10<sup>4</sup>~1.2×10<sup>5</sup>個のCD34陽性細胞を、尾静脈内投与により移植した。その後、フローサイトメトリーにより末梢血、骨髓、脾臓、胸腺などからヒトCD45、CD19、CD3陽性細胞を検出し、それぞれヒトリンパ球、ヒトB細胞、ヒトT細胞分化の指標とした。

### 4. EBV感染実験

EBVは、Akata細胞の培養上清を0.45 $\mu$ mフィルターを通過させたのちに尾静脈内に接種した。

### 5. 病理学的解析

EBV感染マウスの組織はホルマリン固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン-エオジン染色により観察した。EBV感染細胞の同定は、EBER in situ hybridizationとCD20の二重染色により行った。

### 6. EBV遺伝子発現の解析

EBV遺伝子発現はRT-PCR法、免疫化学染色、in situ hybridization法により解析した。

### 7. T細胞除去実験

ヒト化マウスに10<sup>2</sup>TD<sub>50</sub>のEBVを感染させ、3週間後にT細胞表面マーカーCD3に結合するOKT-3抗体（2.0~2.5 $\mu$ g/mouse）を週4~5回の間隔で静脈内投与した。このマウスの生存曲線をOKT3を投与しない対照と比較し、その差をLogrank法により検定した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿

名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京脐帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. EBV 持続感染マウスの経過観察

昨年度の研究では、EBV 感染量が 10 TD<sub>50</sub> (50% transforming dose)以下の場合、約半数のマウスはリンパ腫を発症せず不顕性持続感染状態となることが分かった。末梢血 EBV DNA 量は感染後 5~10 週にいったん上昇した後検出感度以下に低下した。一部のマウスでは、末梢血 EBV DNA の上昇と低下が繰り返された。このような EBV DNA 量の変化にやや遅れて末梢血 CD8 細胞が増減を繰り返すマウス個体も認められた(図 1)。T 細胞が EBV に応答して増殖し、防御作用を有することを示唆する結果と考えられる。持続感染マウスを安楽死させ主要臓器を観察したところ、一部で脾臓が若干肥大していた以外は、肉眼的な異常は認められなかった。

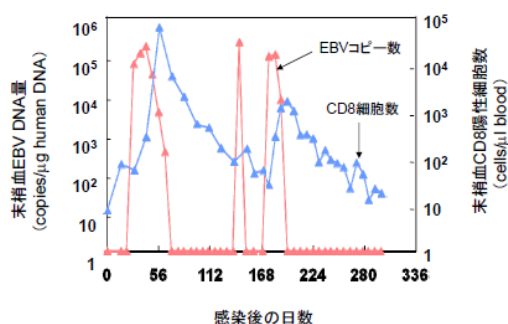


図 1 不顕性持続感染状態のマウスにおける末梢血中 EBV DNA 量および CD8 細胞数の変化。

### 2. 不顕性持続感染における標的細胞の解析

ヒトの EBV 潜伏感染においては、EBV は記憶 B 細胞に感染し、ほぼ全てのウイルス遺伝子発現を停止させることにより、免疫監視機構から免れている。EBV 持続感染マウスにおける感染細胞を EBER in situ hybridization と免疫化学染色により検討したところ、EBV は CD20 抗体陽性で細胞質が比較的大きい、やや大型の B 細胞に感染していることが分かった(図 2)。記憶 B 細胞は通常小型細胞とされているので、形態的には異なっている。

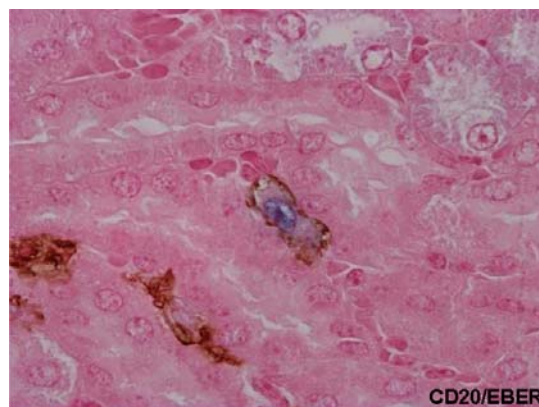


図 2. 不顕性持続感染マウス肝臓における EBV 感染細胞. CD20 の免疫化学染色と EBER in situ hybridization を同時に行った。

### 3. 不顕性持続感染における EBV 遺伝子発現

不顕性持続感染マウスの脾臓から RNA を精製し RT-PCR 法により EBV 遺伝子発現を解析したところ、EBNA1, EBNA2, LMP1 の発現が認められた(図 3)。これは、latency III 型の EBV 遺伝子発現を示す細胞が含まれることを示すが、健常成人における EBV 潜伏感染では、EBV 感染記憶 B 細胞がほとんど全ての遺伝子発現を停止させている(latency 0)のとは異なっている。しかし、マウスでも latency 0

の細胞が含まれる可能性も残されており、今後も検討を続ける予定である。

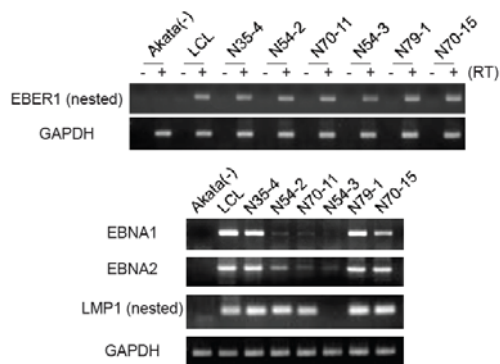


図 3. 不顕性持続感染マウス脾臓における EBV 遺伝子発現. RT-PCR 法による解析.

#### 4. EBV 感染マウスの生存に対し T 細胞除去の影響

これまでに ELISPOT 法などにより EBV 感染細胞で刺激すると IFN- $\gamma$  を産生する CD8 細胞が検出されている。この EBV 特異的 T 細胞が EBV 感染に対して実際に防御的な役割を果たしているかどうかを検討するために、感染マウスに対して OKT3 抗体投与実験を行った。 $10^2$  TD<sub>50</sub> の EBV を感染させた 3 週間後に T 細胞表面マーカー CD3 に結合する OKT-3 抗体を静脈内投与した。これにより末梢血 CD3 陽性 T 細胞数は著明に減少した。マウスの生存曲線を解析したところ、OKT-3 投与群は、対象と比較して有意に生存期間が短かった (Logrank test で  $P=0.008$ ) (図 4)。

#### D. 考察

ヒト化マウスに誘導される不顕性持続感染が、ヒトの EBV 潜伏感染と同等の状態であれば、このマウスにさらに HIV を感染させ免疫不全を誘導することにより EBV 陽性リンパ腫を発症させうると考え

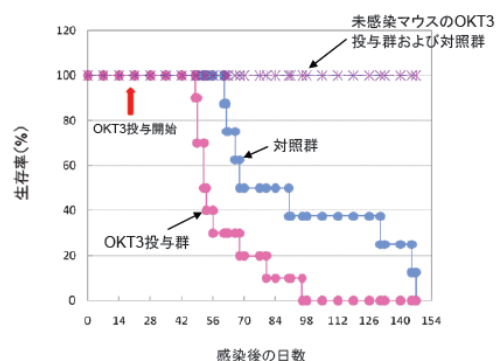


図 4. EBV 感染マウスの生存に対する OKT-3 抗体の作用. EBV 感染後 3 週間で OKT-3 投与を開始し、投与群と対照群のあいだで生存曲線を比較した。

られる。発症過程を再現するという観点からは、これがもっとも厳密な意味でのエイズリンパ腫モデルといえる。本年度は、マウスの不顕性 EBV 持続感染状態を調べ、ヒトの EBV 潜伏感染状態との異同を比較した。ヒト EBV 潜伏感染では、EBV は形態的には小型リンパ球に相当する記憶 B 細胞に感染し、ほとんど全ての EBV 遺伝子発現を停止させることにより、免疫監視機構から逃れている。一方マウスにおける持続感染状態では、EBV は比較的細胞質が大きいやや大型の B 細胞中に検出された。また遺伝子発現を解析したところ、EBNA1, EBNA2, LMP1 の発現が認められ、少なくとも一部の細胞は latency III 型の遺伝子発現パターンをとっていることが推測された。これらの結果は、持続感染マウスにおける EBV 感染細胞は、実際のヒト潜伏感染とは異なる状態にあることを示唆している。一方、OKT-3 抗体投与実験では、感染マウスで誘導される EBV 特異的 T 細胞免疫応答が、実際に EBV に対する防御機構として働くことを示唆しており、持続感染状態のマウスに HIV-1 をさらに感染させ免疫不全

を誘導すれば、EBV 陽性リンパ腫が発症する可能性が高いことが実証された。

一方、EBV 単独で生じるリンパ腫も、組織像 (diffuse large B-cell lymphoma)、細胞表面マーカー発現 (活性化 B 細胞パターン)、EBV 遺伝子発現 (latency III 型) の全てにおいてエイズリンパ腫と一致しているため、こちらも疾患モデルとして有用であると考えており、これを用いての治療薬開発を開始している。

## E. 結論

EBV 持続感染状態のマウスでは、EBV がやや大型の芽球様 B 細胞に感染すること、EBNA1, EBNA2, LMP1 を発現する latency III 型 EBV 遺伝子発現を示す細胞を含むことから、ヒトにおける EBV 潜伏感染とは異なる側面があることが示唆された。一方、EBV 感染後に OKT-3 抗体投与により T 細胞を除去すると、マウスの生存期間が短縮されることから、マウスにおいても T 細胞免疫応答が防御的な役割を果たすことが示唆された。

## F. 健康危機情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J. Infect. Dis.* 198: 673–682, 2008.

2) Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., Yajima, M., and Fujiwara, S. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Virus Res.* 131: 170-179, 2008.

3) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.

### 2. 著書

1) 藤原成悦. 動物モデル. 「EB ウイルス」(高田賢蔵 監修). 診断と治療社、東京, pp88-92、2008.

### 3. 学会発表

1) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、服部高明、渡辺睦房、富満弘之、横田隆徳、水澤英洋、今留謙一、藤原成悦. 化学療法後に運動神経優位の末梢神経障害を認めた慢性活動性 EB ウイルス感染症. 第 18 回 EB ウイルス感染症研究会. 2008 年 3 月 8 日、東京.

2) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、今留謙一、藤原成悦. Capizzi 療法 AraC 投与時に高度の発熱、心不全を合併した慢性活動性 EB ウイルス感染症成人例 3 例の臨床経過の検討. 第 18 回 EB ウイルス感染症研究会. 2008 年 3 月 8 日、東京.

3) 矢島美彩子、今留謙一、中川温子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、伊藤守、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続



感染. EB ウイルス研究会. 2008 年 7 月 18 日、米子.

4) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26 日、岡山.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

## エイズリンパ腫発症モデルと薬剤治療モデルの確立

分担研究者 清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所  
フロンティア研究室ウイルス治療学 准教授

### 研究要旨

エイズ関連悪性リンパ腫には化学療法が有効であるが、再発率が高く多くの場合治療抵抗性となるため、化学療法剤と違った作用機作を持つ薬剤の開発が求められている。我々はエイズリンパ腫の約半数が EB ウイルス (EBV) 陽性であることに着目し、EBV が存在することにより選択毒性を発揮する薬剤の探索を行った。その結果、EBV が持つチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化される薬剤 (2'-fluoro-4'-thio-arabinofuranosyl-methyl-uracil) を見出し、EBV 感染細胞株に対する特異的かつ強力な増殖抑制効果があることを確認した。今後 EBV 陽性エイズ関連悪性リンパ腫の新しい治療薬としての有効性を動物実験により確認していく予定である。

### A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の感染者は年々増加しており、2008 年に新たに判明した HIV 感染者・エイズ患者は 1545 人と報告され、6 年連続最多を更新している（厚生労働省エイズ動向委員会発表）。一方、近年導入された薬剤治療法 (Highly Active Anti- Retroviral Therapy: HAART 療法) の導入により HIV-1 感染者の予後は大幅に改善され、現在では HIV-1 感染症は治療可能な慢性疾患となった。しかし、HAART 療法によっても感染者から HIV-1 を完全に排除することは不可能であり、抗ウイルス剤の長期服用による副作用や薬剤耐性 HIV-1 の出現など多くの問題が生じている。さらに、エイズ関連悪性リンパ腫 (エイズリンパ腫) の発症率は HAART 療法導入後もあまり下がっておらず、また再発率が高く再発後は治療抵抗性となるため、現在でもエイズ患者の長期的予後を脅かす最大の要因となっている。エイズリンパ腫患者全体に占める EBV 陽性例は減少傾向にあるものの、依然半数近くのエイズリンパ腫は EBV 陽性である。我々は EBV 陽性エイズリンパ腫の治療法を確立するため、EBV が存在することによ

り選択毒性を発揮する薬剤の探索を行った。その結果、EBV がコードするチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化され細胞毒性を発揮する薬剤 (2'-fluoro-4'-thio-arabinofuranosyl-methyl-uracil: YMS-95145) を見出した（京都大学ウイルス研究所児玉栄一博士との共同研究）。従来、EBV-TK 遺伝子は早期遺伝子に分類され、EBV 陽性エイズリンパ腫のような EBV 潜伏感染細胞に発現するかどうか詳細な検討はなされていない。本研究では、様々な EBV 感染細胞株の EBV-TK 遺伝子発現の解析とそれら細胞株に対する YMS-95145 の効果を確認することを通じて、YMS-95145 のエイズリンパ腫に対する治療薬としての可能性を検討することを目的に研究を行った。

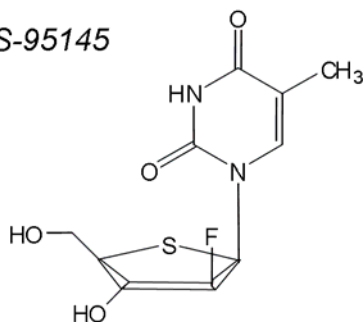
### B. 研究方法

#### 1. 抗ウイルス剤

今回使用した YMS-95145 は、ヤマサ醤油株式会社により合成、供給されたものを使用した。また、コントロールとして AZT, BVaraU, BVDU, GCV, ACV を使用した。YMS-95145 の構造式を以下に

示す。

YMS-95145



## 2. EBV-TK 導入細胞の増殖を抑制する薬剤の探索

EBV 感染細胞の増殖抑制を指標に薬剤の検索を行った。ヒトゲノム由来および EBV ゲノム由来のチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (hu-TK or EBV-TK) を pCIneo ベクター (薬剤耐性マーカーとサイトメガロウイルスのプロモートおよび polyA シグナルを持つ：プロメガ) にそれぞれクローニングした。

それぞれのプラスミドを TK 遺伝子を欠損しているヒト骨肉種細胞由来の 143BTK(-) 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を各種薬剤存在下で培養を行うことにより hu-TK 導入細胞には毒性を示さず、EBV-TK 導入細胞に毒性を示す薬剤の探索を MTT アッセイにより行った。

## 3. EBV 陽性細胞株

EBV 陽性細胞株に対する増殖抑制効果を測定するため、EBV 陽性 B 細胞株 (B95a, NC37)、EBV 陽性 NK 細胞株 (KAI3, SNK-6, SNK-10, YT-A1)、EBV 陽性 T 細胞株 (SNT-8, SNT-15, SNT-16)、コントロールとして EBV 陰性 T 細胞株 (H9, Jurkat, PM-1, SupT1) を使用した。

## 4. EBV-TK 遺伝子発現の定量

EBV-TK は EBV ゲノム BamHIX 断片上の左向きのオープンリーディングフレーム BXLFI にコードされていることが明らかとなっているため、BXLFI 遺伝子の中に下記のような RT-PCR 用のプライマー・プローブを設計した。

Primer F: CGCATCGGTTCAGGGACTAC

Primer R: GTGTGGGAAAGACTACTATGCTGAATC

Probe : 6FAM-TCAGGTCCCCAAAAGACAGCCTTC-  
AAA-iowaBlack

RNA 抽出: QIAGEN RNeasy mini kit により抽出した。

DNaseI 処理: RNA 抽出後、TAKARA DNaseI で 37°C 15 分間処理し、再度 QIAGEN RNeasy mini kit にてクリーンアップした。

RT-PCR: 下記の条件で RT-PCR を行った。

RNA solution	1 $\mu$ l
X2 Buffer	10 $\mu$ l
10 $\mu$ M Primer Mix	1 $\mu$ l
4 $\mu$ M Probe	1 $\mu$ l
RT-taq polymerase	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	6.5 $\mu$ l

-----  
Total 20  $\mu$  l

## RT-PCR Reaction

RT reaction	50°C	20 分
Denature	95°C	15 分
PCR (50Cycle)	95°C	0 秒
	60°C	30 秒

PCR (DNaseI 処理後の残存 DNA 確認)

RNA solution	1 $\mu$ l
AB gene X10 Buffer	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M Primer Mix	2 $\mu$ l
4 $\mu$ M Probe	1 $\mu$ l
AB gene taq polymerase and anti-taq high	0.2 $\mu$ l
20mg/ml BSA	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	12.3 $\mu$ l

-----  
Total 20  $\mu$  l

## PCR Reaction

Denature	95°C	0 秒
PCR (45Cycle)	95°C	0 秒
	60°C	20 秒

## (倫理面への配慮)

研究にはヒト臍帯血を移植したマウス (ヒト化マウス) 由来の試料を一部使用した。ヒト化マウスの作成に当たっては、以下の点に留意した。

1. 臍帯血の使用に関しては、国立感染症研究所、日本大学医学部および東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。
2. 臍帯血の採取は、あらかじめ医師を通じて妊

産婦に研究内容を説明し、文書による承諾を得た上で行った。実際の採取は産婦人科の医師が行い、匿名処理を行うなど研究者には必要以上に提供者の情報が伝わらないよう留意した。また、臍帯血は他の研究目的には使用しないため、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

3. 動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。放射線照射、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネンブタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。これは動物実験における実験処置に対する倫理基準のカテゴリーB（動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験）レベルの実験に相当する。

## C. 研究結果

### 1. EBV-TK発現細胞に対する薬剤の効果

実験に使用した薬剤（YMS-95145, AZT, BVaraU, BVDU, GCV, ACV）のヒト骨肉種細胞由来143BTK(-)細胞に対する細胞毒性 CC50 値（50%細胞毒性濃度）は何れも 100  $\mu$ M 以上であり、また hu-TK 導入細胞に対する効果も 100  $\mu$ M 以上だった。EBV-TK 導入細胞に対する効果は、YMS-95145 以外は 100  $\mu$ M 以上だったのに対して YMS-95145 は 0.11  $\mu$ M と際立った低値を示し、CC50 値を 50%有効濃度 EC50 値で割った有効係数 SI 値（Selectivity Index）は 2700 以上と非常に高値を示し、YMS-95145 は EBV-TK 陽性細胞に選択的に細胞毒性を示す非常に有望な薬剤であることが示された。

### 2. EBV陽性細胞株に対するYMS-95145 の効果

YMS-95145 の EBV 陽性細胞株に対する効果を検討したところ、B 細胞系の B95a, NC37、NK 細胞系の EBV 陽性 NK 細胞株 KAI3, SNK-6, SNK-10, YT-A1、EBV 陽性 T 細胞株 SNT-8, SNT-15, SNT-16 に対する CC50 は何れも 10  $\mu$ M 以下だったが、EBV 陰性のコントロール細胞株 H9, Jurkat, PM-1, SupT1 に対する CC50 は何れも一桁多い 100  $\mu$ M 以上であり、YMS-95145 が EBV 陽性細胞株に対して選択的増殖抑制効果を持つことが示され、治療薬候補になりうることを示唆された。

### 3. EBV-TK 遺伝子発現の解析

EBV 陽性あるいは陰性細胞株と EBV 感染あるいは非感染ヒト化 NOG マウスの組織における EBV-TK 遺伝子発現を検討した。その結果は下記の通りで、EBV 陽性サンプルは全てすべて EBV-TK 遺伝子発現が陽性だった。

Sample	EBV genome	EBV-TK (copies/ $\mu$ g RNA)
SNK-6	+	$2.0 \times 10^2$
SNT-8	+	$2.5 \times 10^2$
SNK-10	+	$1.5 \times 10^2$
マウス spleen	+	$2.0 \times 10^3$
マウス liver	+	$4.2 \times 10^3$
マウス PBMC	+	$2.2 \times 10^3$
KYG1	-	Negative
Huh-7	-	Negative
PHK160b	-	Negative
マウス spleen	-	Negative
マウス liver	-	Negative
マウス PBMC	-	Negative

## D. 考察

1. ヘルペスウイルスは自身の TK 遺伝子を持つため、ヒト TK によってはリン酸化されずヘルペスウイルス TK によりリン酸化されて初めて効果を発揮する薬剤がヘルペスウイルス感染細胞に選択毒性を示す。そのような効果を持つ薬剤が多数開発され、単純ヘルペスウイルスに有効なアシクロビルやサイトメガロウイルスに有効なガンシクロビルが実用化されている。しかし、何れの薬剤も EBV に対する効果は限定的で、EBV 関連疾患の治療薬として確立された薬剤は開発されていない。また、他のヘルペスウイルスはウイルスの増殖に伴って病変が現れるので、ウイルス複製サイクルで発現する TK を標的とした薬剤が有効であるが、EBV 潜伏感染細胞の増殖が病因となる EBV 感染症では、早期抗原に分類される EBV-TK 遺伝子を標的とした薬剤の効果は疑問視されていた。しかし、EBV-TK 存在下でのみ細胞増殖抑制効果を発揮する YMS-95145 を見出し、しかも EBV 潜伏感染細胞中に EBV-TK が発現されているとの実験結

果は、EBV 関連疾患の治療薬を開発する際に非常に重要な知見である。

2. YMS-95145 は 10  $\mu$  M 濃度で EBV 陽性細胞株の増殖を抑制するが、EBV 陰性細胞株の増殖を抑制する濃度は 100  $\mu$  M 以上であることから、従来の薬剤に比べて EBV 陽性細胞に非常に強い選択毒性を有する薬剤候補と考えられる。

3. 今回用いた EBV 陽性細胞株および EBV 感染ヒト化 NOG マウス組織中には EBV ゲノムが増殖サイクルに入っていることを示す BZLF1 遺伝子発現は検出されず、少なくとも EBV 感染細胞の大部分は EBV 潜伏感染細胞と考えられる。EBV 潜伏感染細胞中に EBV-TK 遺伝子が発現していることの実験結果は新しい知見であり、EBV 関連疾患に対する治療薬を開発する上で重要な発見である。EBV 関連疾患の原因細胞はリンパ系の B, T, NK 細胞に加え上皮細胞（上咽頭癌や胃癌）と多岐に渡っているため、今回発見した現象が普遍性を持つものか否か検討していきたい。

3. 倫理委員会への申請などが必要なため、EBV 陽性エイズリンパ腫患者のリンパ腫細胞中における EBV-TK 遺伝子の発現状況を今年度中に検討することができなかった。今後必要な手続きを進め検討していく予定である。

4. 我々はヒト化マウスに EBV を感染し、B 細胞リンパ腫を発生させることに成功している。発生する B リンパ腫は EBV 陽性エイズリンパ腫と同様に全ての EBV 潜伏感染関連遺伝子が発現する 3 型の EBV 潜伏感染細胞であることが明らかとなっている。次年度は、YMS-95145 をエイズリンパ腫モデルマウスに投与し、リンパ腫の発生の抑制・リンパ腫退縮効果の有無を検討するなど、YMS-95145 の実用化を目指した研究を行っていく予定である。

## E. 結論

我々はエイズリンパ腫の約半数が EB ウイルス (EBV) 陽性であることに着目し、EBV が存在することにより選択毒性を発揮する薬剤の検索を行った。その結果、EBV が持つチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化される薬剤 (2'-fluoro-4'-thio- arabinofuranosyl-methyl-uracil) を見出し、EBV 感染細胞株

に対する特異的かつ強力な増殖抑制効果があることを確認した。EBV-TK は EBV 潜伏感染細胞中にも発現していることが確認されたため、EBV 陽性エイズリンパ腫をはじめ様々な EBV 感染疾患に有効な可能性がある。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

1. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 52(2):136-138, 2008
2. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 92(7):928-932, 2008.
3. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpete. *British Journal of Ophthalmology* 92(4):505-8. 2008.
4. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor-kappaB. *Virus research*, 131(2):170-179, 2008.
5. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S,

Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S.

A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *Journal of Infectious Diseases*. 198(5):673- 82, 2008.

6. Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T.

Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clinical Experimental Immunology* 151:519-527, 2008.

7. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes and Infection* (in press)

8. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏 ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜内皮炎の4例 臨床眼科 2008, 62:1061-1065.

9. 鴨居功樹、杉田直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月學、森浩士、宮永将、宮田和典、清水則夫 皮膚症状を伴わない水痘帯状 疱疹ウイルス前部ぶどう膜炎の3例 臨床眼科 2008, 62: 1067-1071.

#### 国内学会発表

1. 今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、中川温子、川野布由子、藤原成悦 NOG マウスを用いた慢性活動性 EB ウイルス感染症モデルの作製 第5回 EB ウイルス研究会 鳥取 7/18/2008

2. 鴨居功樹、杉田直、菅本良治、高瀬博、望月學、清水則夫、渡邊健 硝子体液の定量 PCR で診断でき

た細菌および真菌混合感染による遅発性眼内炎の1例 第42回日本眼炎症学会 福岡市 7/4/2008

3. 山本紗也香、杉田直、二神百合、堀江 真太郎、望月學、清水則夫、森尾友宏 角膜病変を伴わない HSV-1 関連虹彩毛様体炎の3症例 第42回日本眼炎症学会 福岡市 7/4/2008

4. 宮永将、杉田直、清水則夫、森尾友宏、宮田和典、望月學 サイトメガロウイルスによる虹彩炎と角膜内皮炎の臨床像比較 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/26/2008

5. 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學 帯状疱疹に伴う角結膜炎の涙液中 VZV-DNA 量および眼所見 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/26/2008

6. 鴨居功樹、高瀬博、杉田直、菅本良治、田中裕一郎、望月 學、渡邊健、清水則夫 Broad-range PCR システムで診断した真菌性眼内炎の1例 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/25/2008

7. 清水則夫 再生医療とウイルス安全性確保 第8回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 東京 12/12/2008

#### 国際学会発表

Fox CP, Long HM, Lowe C, Shimizu N and Rowe M. LMP2A AS A TARGET FOR T CELL RECOGNITION IN EBV-ASSOCIATED T AND NK CELL TUMOURS EBV Association General meeting, November 2008, Guangzhou, China.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



## エイズ関連悪性リンパ腫発症マウスモデルの確立

分担研究者 岡田 誠治 熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 教授

研究協力者 鈴 伸也 熊本大学エイズ学研究センター・予防開発分野 准教授

研究要旨 エイズリンパ腫の病態解析と新規治療法の開発に供するために、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルの開発を進めている。新規高度免疫不全マウス (NOD/Scid/Jak3 欠損マウス) 腹腔内にヒト Primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株を移植することにより、PEL マウスモデルを樹立した。更に MTT 法によるスクリーニングの結果得られた NF- $\kappa$ B 阻害剤 Cepharanthine (CEP) は、PEL の増殖を in vivo においても阻害した。CEP は、PEL の新たな治療薬として期待される。

### A. 研究目的

本研究の目的は、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを作成し、エイズ関連リンパ腫の標準的な治療法、新規治療法の開発に供することである。本年度は、特に HIV-1 感染者に多い Primary effusion lymphoma (PEL) の治療モデル作成に重点をおいて研究を行った。

### B. 研究方法

ヒト Primary effusion lymphoma (PEL) 細胞株 (BCBL-1, TY-1, RM-P1) と Burkitt リンパ腫細胞株 (Raji 等) に様々な薬剤や抗体を添加し、MTT 法によりその効果を調べた。

高度免疫不全マウス NOD/Scid/Jak-3 欠損マウスは、NOD/Scid マウスに Jak-3 欠損マウス (理化学研究所 RCAI 斉藤隆博士から供与) を 10 世代バッククロスして作成した。NOD/Scid/Jak-3

欠損マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植して PEL モデルマウスを作成し、更に薬剤投与による治療モデルを作成した。

#### (倫理面への配慮)

免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学本荘地区動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。動物実験は、「熊本大学動物実験指針」を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行っている。動物実験における実験処置に対する倫理基準では、カテゴリー B (動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験) レベルの実験であり、解析時には「動物の処分方法に関する指針」を遵守して、頸椎脱臼により安楽死させた。

### C. 研究結果



### 1) MTT 法による抗 PEL 薬剤のスクリーニング

PEL では NF- $\kappa$ B が活性化していることが知られていることから、NF- $\kappa$ B 阻害作用のある物質を中心に抗 PEL 薬剤のスクリーニングを行い、数種類の候補物質を得た。それらの薬剤のうち、ツヅラフジ科植物から得られたアルカロイドである Cepharanthine (CEP) は、in vitro において強力な抗腫瘍効果を示し (図 1)、既に臨床の場で使われていて、副作用が極めて少ないことから、本年度は CEP を中心に解析を行った。

### 2) Cepharanthine (CEP) の作用機序

PEL 細胞株に CEP を投与後、ウエスタンブロット法にて NF- $\kappa$ B p65 の発現を検討した。細胞内の p65 は増加していたがリン酸化 (活性化) p65 は減少しており、核内の p65 量も減少していたことから、CEP は、細胞質内で NF- $\kappa$ B p65 の活性化を抑制することにより、NF- $\kappa$ B 阻害作用を呈することが判明した (図 2)。

### 3) PEL 発症マウスモデルの樹立

NOD/Scid/Jak-3 欠損マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植して PEL 発症マウスモデルを作成した。BCBL-1  $1 \times 10^7$  個を腹腔内に移植したところ 3 週間後には腹水の増加と肺・肝・脾臓に転移が認められた。

### 4) CEP による PEL マウスモデルの治療

NOD/Scid/Jak-3 欠損マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植し、5 日目より CEP 10mg/kg を連日腹腔内投与した。その結果、CEP 投与群では、明らかな腹水量の低下と転移の抑制が認められ、CEP の有効性が確認された (図 3)。

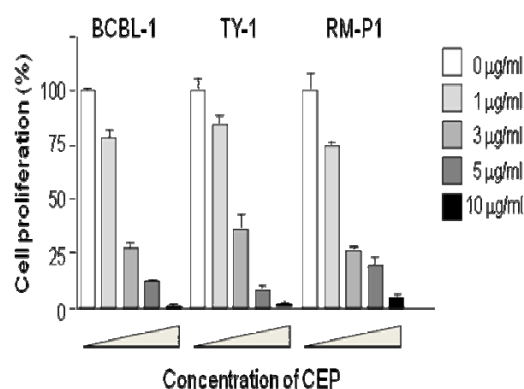


図 1. Cepharanthine (CEP) の抗 PEL 作用. MTT 法により PEL 細胞株に対する CEP の効果を検討した。

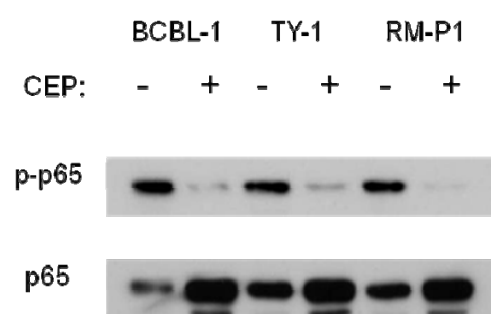


図 2-1. CEP による NF- $\kappa$ B p65 活性化抑制. CEP 投与により PEL 細胞株細胞質内の p65 量は増加するがリン酸化は抑制された。

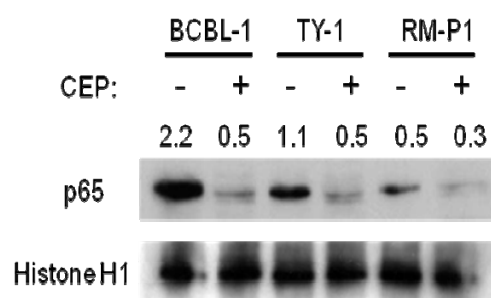


図 2-2. CEP による NF- $\kappa$ B p65 活性化抑制. CEP 投与により核内 NF- $\kappa$ B p65 は減少した。

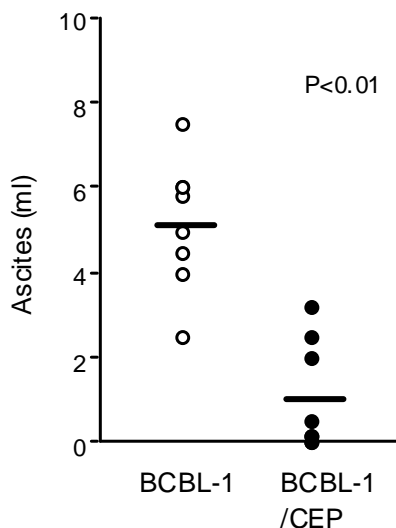


図 3. CEP 投与による腹水貯留の抑制

#### D. 考察

エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを作成した。PEL の治療薬として、NF-κB 阻害物質が期待されているが、本研究でも NF-κB 阻害作用のある種々の薬物が有用であるという知見を得た。特に NF-κB 阻害剤 Cepharanthine は、既に臨床で使われており、重篤な副作用がないことから、PEL の新たな治療薬として期待される。

現在、マウスモデルを用いて、PEL に対する放射線療法、免疫放射線療法などの有効性を確認している。

#### E. 結論

高度免疫不全マウスを用いて、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを樹立した。更に、このマウスモデルを用いて薬剤による治療薬の評価系を確立し、Cepharanthine が Primary Effusion Lymphoma の治療に有効であることを示した。本マウスモデルは、今後エイズ関連悪性リンパ腫の新たな治療法の開発に役立つことが期待される。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T, and Suzu S.; Development of human hematopoietic and acquired immune system in NOD/Scid/Jak3<sup>null</sup> mice engrafted with cord blood-derived human hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 88:476-482, 2008

2. Murakami T, Harada H, Suico MA, Shuto T Suzu S, Kai H, and Okada S; Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine *Mao-to*, efficiently activates the replication of latent HIV-1 in a monocytic cell line. *Biol Pharm Bull* 31(12):2334-2337, 2008

3. Wang X, Xiao G, Zhang Y, Gao X, Okada S, and Liu X; Regulation of *Tcrb* recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. *Nature Immunol* 9(7):794-801, 2008

4. Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, and Okada S; Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol* 87(5):442-443, 2008

(総説等)

- 岡田誠治. フローサイトメトリーのための抗体の標識と細胞の染色. 「抗体実験マニュアル 改訂版」 羊土社. 2008 年 4 月
- 岡田誠治. エイズ関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略. 臨床血液 49(10):1490-1498, 2008.
- 鈴伸也, 岡田誠治. Src キナーゼの新たな役割—ゴルジ体を通して. 血液・腫瘍科 57(3):326-329, 2008.

##### 2. 学会発表

(国際学会)

1. Naoko Takahashi-Makise, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, and Seiji Okada.  
Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma *in vitro* and *in vivo* and induce apoptosis via suppressing the NK-kB pathway. 37<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting International Society of Experimental Hematology July 9-12, 2008. (Boston, USA)
2. Shinichiro Hattori, Kazuhiko Ide, Hirotomo Nakata, Hideki Harada, Satoru Kohgo, Noriyuki Ashida, Hiroyuki Hayakawa, Hiroaki Mitsuya and Seiji Okada. Protection of CD4<sup>+</sup> cells against HIV-1 infection by 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-Deoxyadenosine in hu-PBMC-NOD/SCID/Jak-3-KO mice. Aug. 3-8 2008, XVII International AIDS Conference. (Mexico City, Mexico)

(国内学会)

1. 服部真一郎、原田英樹、鈴伸也、岡田誠治.  
ヒト末梢血単核球を移植した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/jak-3 欠損マウス) におけるフローサイトメトリーを用いた HIV-1 感染の解析. 第 18 回日本サイトメトリー学会学術集会 2008 年 6 月 28-29 日、東京
2. 岡田誠治. エイズ関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略. 第 70 回日本血液学会総会. 教育講演. 2008 年 10 月 10-12 日、京都
3. 永井宏和、岩崎奈美、小田原隆、岡田誠治.  
本邦での AIDS-related lymphoma の診療実態調査. 第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都
4. 水上拓郎、浜口功、滝澤和也、倉光球、百瀬暖佳、益見厚子、岡田誠治、山口一成. 脾臓における造血幹細胞ニッチの解析. 第 70 回

日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都

5. 日吉真照、鈴伸也、岡田誠治. HIV Nef のマクロファージにおける新たなゴルジ体機能の阻害機構. 第 56 回日本ウィルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日、岡山
6. 白石善興、後藤久美子、砥綿知美、島崎達也、古嶋昭博、岡田誠治. Primary Effusion Lymphoma における放射線治療の有効性について. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-11 月 21 日、北九州
7. Ranya Hassan、鈴伸也、日吉真照、岡田誠治. Hierarchical actions of HIV-1 Nef on Hck determined maturation arrest of cytokine receptor, Fms. 第 22 回日本エイズ学会学術集会総会、2008 年 11 月 26 日-11 月 28 日、大阪
8. 服部真一郎、井出一彦、中田浩智、原田英樹、鈴伸也、向後悟、芦田則之、早川弘之、満屋裕明、岡田誠治.  
Hu-PBMC-NOD/SCID/Jak-3-KO マウスを用いた核酸系逆転写酵素阻害剤、4'-Etynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine による抗 HIV-1 効果の検討. 第 22 回日本エイズ学会学術集会総会、2008 年 11 月 26 日-11 月 28 日、大阪
9. 岡田誠治. AIDS 関連悪性リンパ腫の治療戦略. 第 22 回日本エイズ学会シンポジウム 9. 「エイズ診療、これからの重要課題. AIDS 関連悪性リンパ腫」、2008 年 11 月 26-28 日、大阪

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

# エイズ関連非ホジキンリンパ腫（ARNHL）

## 治療の手引き Ver 1.0

味澤 篤<sup>\*1</sup>、永井宏和<sup>\*2</sup>、小田原隆<sup>\*3</sup>、照井康仁<sup>\*4</sup>  
上平朝子<sup>\*5</sup>、四本美保子<sup>\*6</sup>、萩原將太郎<sup>\*7</sup>、岡田誠治<sup>\*8</sup>

HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に関する  
多面的治療戦略開発に関する研究班

\*1 都立駒込病院感染症科\*2 名古屋医療センター臨床研修センター  
\*3 東京大学医科学研究所感染免疫内科\*4 癌研究会有明病院癌化学療法センター  
\*5 大阪医療センター免疫感染症科\*6 東京医科大学臨床検査医学科  
\*7 国立国際医療センター血液内科\*8 熊本大学エイズ学研究センター

# エイズ関連非ホジキンリンパ腫（ARNHL）治療の手引き

味澤 篤<sup>\*1</sup>、永井宏和<sup>\*2</sup>、小田原隆<sup>\*3</sup>、照井康仁<sup>\*4</sup>  
上平朝子<sup>\*5</sup>、四本美保子<sup>\*6</sup>、萩原将太郎<sup>\*7</sup>、岡田誠治<sup>\*8</sup>

## HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に関する 多面的治療戦略開発に関する研究班

\*1 都立駒込病院感染症科\*2 名古屋医療センター臨床研修センター  
\*3 東京大学医科学研究所感染免疫内科\*4 癌研究会有明病院癌化学療法センター  
\*5 大阪医療センター免疫感染症科\*6 東京医科大学臨床検査医学科  
\*7 国立国際医療センター血液内科\*8 熊本大学エイズ学研究センター

この手引きの対象はacquired immunodeficiency syndrome (AIDS)に関連した非ホジキン悪性リンパ腫（ARNHL）の経験のない血液科医師および human immunodeficiency virus (HIV) 担当医師である。British HIV Association の「HIV Associated Malignancies」、National Cancer Institute のホームページ「AIDS-Related Lymphoma Treatment」 および National Comprehensive Cancer Network の「Non Hodgkin's Lymphoma」を参考に、ARNHL が非 HIV 感染者における非ホジキン悪性リンパ腫とどのような点で異なり、その治療方針はどうあるべきかを総論的に記載している。

### 1. はじめに

ARNHL は HIV 感染症の進行した状態で生じる疾患である。CD4 陽性リンパ球数 (CD4) <200/μL あるいは AIDS の既往を持つ患者に生じることが多い<sup>1)</sup>。また節外性の非ホジキン悪性リンパ腫 (NHL) から HIV 感染が判明する症例も国内で増加してきている。

ARNHL の誘因としては、HIV による免疫不全、慢性の B 細胞への抗原刺激、遺伝的異常、サイトカインの調節不良、EB ウイルスや human herpes virus 8 (HHV8) の影響などが考えられている。HIV 感染者では IL-6、IL-10、sCD23、sCD27、sCD30 および sCD40 が高値であり、これらは B 細胞の増殖因子でありアポトーシスを抑制する因子である。

### 2. 現 状

CD4 陽性細胞数 <200/μL あるいは AIDS 指標疾患発症後に、悪性リンパ腫が生じる相対危険度は、immunoblastic lymphoma が 627x で、diffuse large B-cell lymphoma で 145x とされる<sup>2b)</sup>。カポジ肉腫が男性同性愛者によく見られるの

に対し、悪性リンパ腫はあらゆる層にみられる<sup>4b)</sup>。ARNHL では immunoblastic lymphoma と脳原発悪性リンパ腫が、CD4 が 100 低下するとそれぞれ相対危険度が 1.64、2.29 と増加する<sup>6)</sup>。ARNHL の危険性は CD4 が低いほどリスクが高くなる (図 1)。

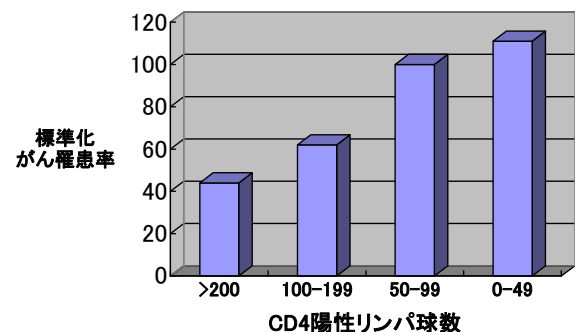


図1 エイズ関連非ホジキンリンパ腫における  
標準化がん罹患率と CD4 陽性リンパ球数<sup>6)</sup>

### 3. 分 類

ARNHL の95%以上はB細胞由来で、Burkitt's lymphoma、diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)、immunoblastic lymphoma および primary effusion lymphoma がみられるが、頻度的にはDLBCL 次いで Burkitt's lymphoma が多い。表1に HIV でみられる悪性リンパ腫を示す。

### 4. 臨床経過

#### 診断

生検により診断する。組織所見により治療方針が異なってくるので重要な検査である。

表 1 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の分類

- 1.免疫正常者でもみられるリンパ腫 (Lymphomas also occurring in immunocompetent patients)
  - Burkitt lymphoma
    - Classical
    - With plasmacytoid differentiation
    - Atypical
  - Diffuse large B-cell lymphoma
    - Centroblastic
    - Immunoblastic
  - Extranodal marginal zone B-cell-lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type; MALT lymphoma (rare)
  - Peripheral T-cell lymphoma (rare)
  - Classical Hodgkin lymphoma
- 2.HIV 感染者により生じやすいリンパ腫  
(Lymphomas occurring more specifically in HIV+ patients)
  - Primary effusion lymphoma
  - Plasmablastic lymphoma of the oral cavity
- 3.免疫不全状態でもみられるリンパ腫 (Lymphomas also occurring in immunodeficiency states)
  - Polymorphic B-cell lymphoma (PTLD-like)

## 症状

非HIV感染者に比べ診断時の病期が進行している。発熱、夜間盗汗および10%以上の体重減少などのB症状を75-85%に認める。中枢神経、消化管、骨髄、肝臓、肺、副腎など節外臓器に高頻度に発生する。骨髄および中枢神経系への浸潤も、非HIV感染悪性リンパ腫に比べ高率である<sup>24)</sup>。

## 検査

表2に示すような検査を行う。

## 病期分類

初回治療前に解剖学的な病変の広がりについて定型書式を用い評価を行い、臨床病期を決定する(表3)。再発した場合は、再発時点での解剖学的な病変の広がりを記録することは勧められるが、再治療時の病期分類(Ⅰ病期)については初発時の病期分類とその臨床的意味を混同してはならない。

## 予後

ARNHLの予後不良の因子として、①CD4<100/ $\mu$ L、②病期 StageⅢ or Ⅳ、③年齢 35歳以上、④PS不良、⑤AIDS

表 2 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の際に行うべき検査

	検査項目	意義
NHL 関連	CBC	
	生化学	
	sIL-2	
	HBV、HCV	HBVの合併が多い
	頸部から骨盤 CT	PCPやMAC症の鑑別にも必要
	頭部造影 MRI	トキソプラズマや中枢神経系のリンパ腫の鑑別にも必要
ARNHL 関連	FDG-PET	
	髄液検査	ARNHLでは中枢浸潤が高率
HIV 関連	骨髄検査	ARNHLでは骨髄浸潤が高率
	CD4 陽性リンパ球数	必須検査
	HIV-RNA	必須検査
	梅毒	合併が多い
	クリプトコッカス抗原	日和見感染症の検索として
	トキソプラズマ IgG	日和見感染症の検索として
	CMV-Ag	日和見感染症の検索として
	発熱時抗酸菌血液培養	日和見感染症の検索として
	Ga シンチグラフィ	PCPやMACを疑う際にも有用
	眼科	CMV 網膜炎などの検索

表 3 病期分類

病期Ⅰ: 単独リンパ節領域の病変(Ⅰ); またはリンパ節病変を欠く単独リンパ外臓器または部位の限局性病変 (ⅠE)(ホジキンリンパ腫では稀)。

病期Ⅱ: 横隔膜の同側にある2つ以上のリンパ節領域の病変(Ⅱ); または所属リンパ節病変と関連している単独リンパ外臓器または部位の限局性病変で、横隔膜の同側にあるその他のリンパ節領域の病変は有ってもなくてもよい(ⅡE)。病変のある領域の数は下付きで、例えばⅡ3のように表してもよい。

病期Ⅲ: 横隔膜の両側にあるリンパ節領域の病変(Ⅲ)、それは更に隣接するリンパ節病変と関連しているリンパ外進展を伴ったり(ⅢIE)、または脾臓病変を伴ったり(ⅢIS)、あるいはその両者(ⅢIE,S)を伴ってもよい。

病期Ⅳ: 1つ以上のリンパ外臓器の瀰漫性または播種性病変で、関連するリンパ節病変の有無を問わない; または隣接する所属リンパ節病変を欠く孤立したリンパ外臓器病変であるが、離れた部位の病変を合わせもつ場合。後出の「解剖学的病期診断規準」に該当する肝臓または骨髄のいかなる病変、あるいは肺の小結節性病変もⅣ期とする。病期Ⅳの病変の場所は、ホジキンリンパ腫の部分で記述されている表に記載された表記法に従ってその部位を更に特定することによって確認される。

発症、⑥静脈麻薬常用者、⑦LDH 高値、⑧Highly active antiretroviral therapy (HAART)への反応不良がある<sup>78)</sup>。

最近では、国際予後指標 (IPI) に CD4 を合わせたものも良く使用される。予後はHAART 以降改善し、生存年数の中央値は24 ヶ月に近づいている。IPI については表4を参照。

表4 国際予後指標 (IPI)

国際非ホジキンリンパ腫予後因子プロジェクトは、アグレッシブ非ホジキンリンパ腫の転帰予測モデルを開発するため、ドキシルビシンを基本とする併用化学療法で治療された数千人のアグレッシブ非ホジキンリンパ腫患者集団の治療前予後因子を用いた。上記のデータセットの多変量解析で認定された因子に基づき、IPI が提唱された。

IPI では5つの治療前特性は独立した統計学的に有意な因子であることが見いだされた: 年齢 ( $\leq 60$  vs.  $> 60$ ); 病期 I または II (限局性) vs. III または IV (進行性); 節外病変数 (0 または 1 vs.  $\geq 2$ ); 患者の一般状態 (PS) (0 または 1 vs.  $\geq 2$ ); および血清 LDH レベル (正常 vs. 正常上限を越える)。

Low risk	0-1
Low-intermediate risk	2
High-intermediate risk	3
High risk	4-5

これら5つの因子は非ホジキンリンパ腫の場合 Ann-Arbor の病期分類を補うものと考えられる。

#### 4. 治療法

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)

推奨治療法

1. CHOP あるいは CDE、EPOCH が推奨される (推奨 B)。HAART 時代になってから比較試験はなく、非 HIV 感染者における CHOP、R-CHOP といった「gold-standard-therapy」が無い。
2. Rituximab は、CD4 $<50/\mu\text{L}$  の場合には治療関連

死亡が生じやすくなるので併用しない (推奨 A)。

3. HAART を併用する (推奨 B)。

4. HAART は抗がん剤との薬物相互作用を考えて選択する (推奨 C)。

#### 治療の変遷

HAART 導入前の 1990 年代初期までは、ARNHL に対して表5に示したようなさまざまな化学療法が行われていたが、いずれも不十分な成績であった<sup>9)</sup>。完全寛解率 (CR) は 50%前後で生存期間も 6 から 11 ヶ月に過ぎず、2 年生存率も 10%程度であった。生存期間が短い原因としては悪性リンパ腫自体のコントロールが十分できないこと (HIV 感染症に伴う潜在的な骨髄障害により、化学療法後の骨髄回復が遅れることも重要な要因) に加えて、HIV 感染症に伴う日和見感染症の合併が高率

表6 エイズ関連非ホジキンリンパ腫に対する m-BACOD 療法の投与量に関する比較 (ACTG142)

	Standard Dose	Low Dose	P Value
No. of Patients	81	94	-
CR	52%	41%	NS
Median survival (mo)	7.75	8.75	NS
Grade III 以上の toxicity	70%	51%	0.008
$<500/\mu\text{L}$ の好中球減少	69%	50%	0.007
日和見感染の合併	23%	22%	NS

文献 14) より

表5 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の化学療法<sup>9)</sup>

Treatment	No. of Patients	CD4+ counts (cells/ $\mu\text{L}$ )	Prior AIDS	Karnofsky PS	Extranodal Disease	Bone Marrow-Positive	CR	Survival (mo)	Ref.
m-BACOD	13	368	NR	70	11 (85%)	2 (15%)	7 (54%)	11	10
COMET-A	38	164	8 (21%)	75	25 (66%)	NR	19 (50%)	6	11
CHOP	30	200-290	4 (13%)	84	21 (70%)	7 (23%)	16 (53%)	8.0-11.4	12
Low dose m-BACOD	42	150	8 (23%)	$>80$	23 (66%)	6 (17%)	16 (38%)	6.6	13
Infusional CDE	12	87	1 (8%)	60	10 (83%)	3 (25%)	8 (67%)	17.4	9

に生じることがあげられた<sup>4)</sup>。AIDS clinical trial team (ACTG 142) によって行われた HAART 以前の m-BACOD 療法 (表 6) では、standard dose では有意に重篤な骨髄障害などを生じるうえに、治療効果も生存率にも有意差が見られなかった<sup>13)14)</sup>。

## CHOP

Ratner らは stavudine (d4T)、lamivudine (3TC) および indinavir (IDV) による HAART と CHOP 療法を併用し、投与量を low-dose 群と standard dose 群に分け比較した。CR 率は standard-dose 群が 48% と low-dose 群の 30%より高かった。一方 grade III あるいはIVの白血球減少を low-dose 群では 25%、G-CSF を併用した standard-dose 群では 12%に認めたが、特に HAART 併用による副作用はみられず、日和見感染症の合併もほとんどみられなかった<sup>15)</sup>。また HAART を併用した CHOP 療法に関する他の報告でも、HAART 以降は生存期間の中央値が 2 年にまで改善した<sup>16)17)</sup>。

The German ARL study group は IPI スコアで調整した 72 例で CHOP と HAART の併用を行い、安全かつ有用であったと報告している<sup>18)</sup>。HAART 以前と以後を比較したケースコントロール研究でも HAART 以後、CHOP の生存率が改善した<sup>19)</sup>。

The AIDS Malignancy Consortium は HAART を併用した低容量と標準量の CHOP を比較した<sup>20)</sup>、40 例が減量した CHOP、25 例が標準量を使用した。CR は標準量の CHOP が有意に高く (48%、一方減量群では 30%)。生存期間についての報告はなく副作用も両群で変化はなかった。

## Infusional Therapy

Sparano らは cyclophosphamide、doxorubicin および etoposide による 24 時間持続点滴静注法 (infusional IDE 療法、図 2 参照) をもちいて治療

day	1	2	3	4
Cyclophosphamide 200mg/m <sup>2</sup> /day 24hr持続静注	4日間			
Doxorubicin 12.5mg/m <sup>2</sup> /day 24hr持続静注	4日間			
Etoposide 60mg/m <sup>2</sup> /day 24hr持続静注	4日間			

- ・骨髄浸潤あるいは組織形がバーキットリンパ腫であれば、頭蓋内照射を行う
- ・日和見感染予防としてST合剤およびフルコナゾールを用いる
- ・G-CSFは day 6 に5 γ/kg/日で開始し、好中球が10000/μL以上になるまで継続する
- ・3週間毎に6コース繰り返す

図2 CDE療法のレジメ

したところ CD4+低値、PS 不良などにもかかわらず優れた CR および生存期間延長がみられ注目を浴びた。その後症例が追加され、HIV 関連悪性リンパ腫 107 例に施行された<sup>21)</sup>。48 例は ddI 単独投与で、59 例は HAART を併用した。両群とも CR 率 (44%) には変化なかったが、HAART 群で生存期間の延長を認めた (表 7 参照)。

Little らは図 3 に示したレジメに従って etoposide、prednisone、vincristine、cyclophosphamide および doxorubicin による 24 時間持続点滴静注法 (EPOCH 療法) をもちいて治療を行った。53 ヶ月 (中央値) の経過観察で全体の生存率は 60%、CR を達成した

day	1	2	3	4	5
Etoposide 50mg/m <sup>2</sup> /day 24hr 持続静注	4日間				
Vincristine 0.4mg/m <sup>2</sup> /day 24hr 持続静注	4日間				
Doxorubicin 10mg/m <sup>2</sup> /day 24hr 持続静注	4日間				
Cyclophosphamide 点滴静注 (cycle 1) CD4 < 100/mm <sup>3</sup> では187mg/m <sup>2</sup> CD4 ≥ 100/mm <sup>3</sup> では375mg/m <sup>2</sup>					↓
Prednisone 60mg/m <sup>2</sup> 終口	↓	↓	↓	↓	↓
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Cyclophosphamide (after cycle 1) 最低好中球数&gt;500/mm<sup>3</sup> 187 mg/m<sup>2</sup>/day前回量より増量 最低好中球数&lt;500/mm<sup>3</sup> 187 mg/m<sup>2</sup>/day前回量より減量 または最低血小板数&lt;25,000/mm<sup>3</sup> Cyclophosphamideは最大投与量 750mg/m<sup>2</sup>/dayとする。</li> <li>・ G-CSFは day 6 に5 γ/kg/日で開始し、好中球が5000/μL以上になるまで継続する</li> <li>・ HAARTは化学療法中は中断する</li> <li>・ 3週間毎に6コース繰り返す (好中球数&gt;1000/mm<sup>3</sup>、血小板数&gt;50,000/mm<sup>3</sup>)</li> </ul>					

図3 Dose adjusted EPOCH療法のレジメ

表 7 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の化学療法と抗 HIV 療法

Treatment		No. of Patients	Median CD4+ counts (cells/μL)	CR (%)	Median survival (mo)	Long term survival (mo)	Antiretroviral therapy	Ref.
infusional CDE	Pre HAART	48	78	44	8.2	12 (48%)	ddI	15
	Post HAART	59	227	44	17.8	12 (55%)	HAART	
CHOP	Low dose	40	138	30	16.3	Not available	d4T+3TC+IDV	16
	Standard dose	23	122	48	Not available			
EPOCH		39	-	74	Not reached	53 (60%)	HAART Suspension	22
infusional CDE with rituximab		74	161	70	Not reached	24(59%)	HAART	23



症例の disease-free が 92%であった。しかし化学療法施行中は、HAART は中断するためか、CD4 陽性リンパ球数が 100/ $\mu$ L 未満の症例での予後は 16%と 100/ $\mu$ L 以上の症例の 87%と比べ不良であった<sup>22)</sup>。また化学療法後の HAART 再開で CD4 が元に戻るには 12 ヶ月を要した。副作用としては grade IV の白血球減少が 29%にみられ、12%は発熱を認めた。

味澤らは、抗腫瘍薬との相互作用の少ない d4T + 3TC + nelfinavir (NFV) を併用した EPOCH 療法を行ったところ、38 ヶ月（中央値）で 11 例中 9 例（81.8%）の生存を認め、特に CD4<100/ $\mu$ L の 7 例においても 37 ヶ月（中央値）で 7 例中 5 例（71.4%）の生存を認めた<sup>24)</sup>。詳細は付録 1 に示す。

#### Rituximab

Rituximab は B リンパ球の表面にある CD20 を標的としたモノクローナル抗体である。Rituximab と CHOP との併用（R-CHOP）は、非 HIV 感染者の DLBCL の生存率を明らかに改善した<sup>25)</sup>。しかし初回投与時は、infusion reaction や腫瘍崩壊症候群が生じることがあるので注意が必要である。図 4 に標準的な R-CHOP のレジメを示す。

HIV 感染者における CHOP と R-CHOP との比較試験では、完全寛解率や生存期間に有意差がなかったが、表 9 に示すように R-CHOP 群で有意に感染症による死亡が多く見られた（14%と 2%、P=0.027）。特に死亡例の 60%が、CD4<50/ $\mu$ L の症例であった<sup>26)</sup>。少なくとも CD4<50/ $\mu$ L の場合は、rituximab の併用は行わない。

表 8 エイズ関連非ホジキンリンパ腫と Rituximab<sup>26)</sup>

	R-CHOP (n=99) %	CHOP (n=50) %
CR	57.6	47.0
PR	8.1	7.8
Stable	8.1	7.8
Progression	8.1	21.6
Death (treatment-related infection)	42(14)	45(2*)

\* P=0.035

別の 2 相試験では、61 例の ARL に R-CHOP を施行したが、特に感染症の増加無く有用性を示した<sup>27)</sup>。しかしこの研究のクライテリアでお進んだ HIV 感染症例は除外することになっており、CD4<50/ $\mu$ L の例は 4 例のみにすぎなかった。

Spina らは Infusional CDE 療法に rituximab を組み合わせ、HAART および G-CSF を併用した 3 件の phase II 試験をまとめた。74 例中 CR は 70%、24 ヶ月で 59%の生存を認めたが、

day	1	2	3	4	5
Rituximab 375mg/m <sup>2</sup>	↓				
点滴静注					
Cyclophosphamide 750mg/m <sup>2</sup>	↓				
点滴静注					
Doxorubicin 50mg/m <sup>2</sup> 静注	↓				
Vincristine 1.4mg/m <sup>2</sup> 静注	↓				
Prednisone 100mg 経口	↓	↓	↓	↓	↓

- Rituximab は生理食塩水で 10 倍に希釈して最終濃度 1mg/ml とし、点滴静注投与する。CHOP の 1-2 日前でも可、初回投与は入院が必要である。薬物有害反応 (infusion-related toxicity) を予防するため、毎回の Rituximab 投与時には点滴開始 30 分前に経口で下記あるいはこれに類似した薬効をもつ薬剤の組合せ (1) 非ピリン系解熱鎮痛剤: アセトアミノフェン (カロナール) (200mg) 2 錠、(2) 抗ヒスタミン剤: d-マレイン酸クロルフェニラミン (ポララミン) (2mg) 1 錠またはジフェンヒドラミン (レスタミン) (10mg) 3 錠で前投薬を行う。
- Cyclophosphamide は生理食塩水 250ml に溶解して 1.5 時間あるいは 500ml に溶解して 2.5 時間で点滴投与
- Doxorubicin は生理食塩水 100ml に溶解して 30 分で点滴投与
- Vincristine は生理食塩水 20ml に溶解して静注するが maximum 2.0 mg

図 4 R-CHOP 療法のレジメ

20 例は原病で、4 例は日和見感染症で、2 例は敗血症で死亡した<sup>23)</sup>。

#### サルベージ療法

HAART 以前にお治療抵抗性あるいは再発した ARL に対する有用な報告は数えるほどであった<sup>28)29)30)</sup>。ESHAP (etoposide, methylprednisolone, high-dose cytarabine, cisplatin) の有効率は 54%を示したが、全例骨髄障害を認め、さらに生存率の中央値は 7 ヶ月にしかすぎなかった<sup>31)32)</sup>。

治療抵抗例に対して、欧米では自家骨髄移植は考慮すべき治療として推奨となっているが<sup>33)34)</sup>、国内ではわずかな経験しかないので限られた施設で行うことが望ましい。Krishnan によると 20 例中 6 例に日和見感染症が見られたが ARL の再発なしの生存率が a progression-free survival は 85% (95% CI 69-100) で全体でも生存率が 85%であった（観察期間は 31.8 ヶ月）<sup>35)</sup>。同様な報告も多い<sup>36)37)</sup>。

#### Burkitt's lymphoma (BL)

##### 推奨治療法

- HIV 感染症に合併した BL の第一選択は、CODOX-M/IVAC あるいは hyperCVAD と思われるが、比較試験は無く DLBCL と同様「gold-standard-therapy」がない（推奨 B）。
- HAART を併用する（推奨 B）。

HIV-BL の予後は、HIV-NHL の中でも予後が最も悪い<sup>23)</sup>。2 つの小規模のレトロスペクティブな研究しかないが、非 HIV 感染者の BL と同様に CODOX-M/IVAC (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, methotrexate / ifosfamide, etoposide, cytarabine)<sup>38)</sup>あるいは hyperCVAD (cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone, methotrexate, cytarabine) が有用である。副作用の程度も非 HIV 感染者と同様であった<sup>39)</sup>。CODOX-M における本邦での

MTX の投与量は1日総投与量が  $3.0\text{g/m}^2$  に減量する（原法は  $6.72\text{g/m}^2$ ）。その他に rituximab-EPOCH が有効であるとの報告もある<sup>40)</sup>。

#### 中枢神経予防

中枢神経への予防は BL および高頻度で髄膜播種が予想されるタイプの DLBCL で行わなければならない（推奨B）プロスペクティブあるいはランダム化された研究は2つしかない<sup>14)26)</sup>が、多くの施設で一般的なプロトコルとして中枢神経予防が行われており、予防法もほぼ統一されている（図5参照）。Small noncleaved cell lymphoma、骨髄浸潤、副鼻腔病変、精巣病変および硬膜病変では中枢神経予防が必要である<sup>26)</sup>。

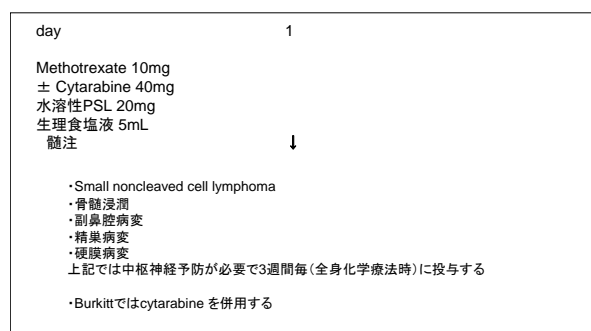


図5 中枢神経予防のレジメ

#### Primary effusion lymphoma および Plasmablastic lymphoma

Primary effusion lymphoma (PEL) は、ARNHL の5%未満にみられ、HHV8感染およびEBV（70-80%陽性）の共感染と関連している<sup>41)</sup>。HIV では体腔内に生じる古典的な PEL に加え、体腔外に病変が見られる solid PEL と呼ばれる病態もとり大腸、皮膚、肺およびリンパ節などにも進展する<sup>42)</sup>。DLBCL に準じて治療を行うが、予後は不良である。

Plasmablastic lymphoma は、口腔内に生じる EBV と強い関係がある HIV 特有の NHL である<sup>43)</sup>。しかし、最近では肛門や副鼻腔、皮膚、精巣および骨などに病変が生じる例も報告されている<sup>44)45)</sup>。予後は不良である。CD20 は陰性であることに注意が必要である。

### 5. Highly active antiretroviral therapy (HAART)

#### HAART の必要性

HAART 導入以前には標準的な投与量で化学療法を行っても、重篤な骨髄障害および日和見感染症の合併により十分な治療効果を得ることができなかった。DLBCL の予後も BL と同レベルで不良であった。

HAART 導入後は、HAART への良好な反応（HIV-RNA が  $200\text{copies/ml}$  以下にコントロールされ、かつ CD4+ が 30% 以上増加）が、悪性リンパ腫の完全寛解率（CR）と有意に関係していることが明らかとなった<sup>8)</sup>。さらに多変量解析を

行ったところ悪性リンパ腫の CR の有無、HAART への良好な反応および化学療法の投与量の3つが各々独立に、患者の生存と関与していた。HAART は有用であるが<sup>16)46)</sup>、HAART 導入により標準的な投与量でも骨髄障害および日和見感染症の合併をコントロールすることができるようになった。

#### 抗がん剤と HAART の相互作用

抗 HIV 薬と抗腫瘍薬には相互作用があり、重篤な副作用をきたす場合がある。核酸系逆転写酵素阻害薬では一般的に抗腫瘍薬との相互作用は少ないが、zidovudine (ZVD) は抗腫瘍薬の骨髄毒性のリスクを増大させることが知られている<sup>47)</sup>。非核酸系逆転写酵素阻害薬である efavirenz (EFV) および nevirapine (NVP) は、肝臓において cytochromes P450-3A (CYP3A) を誘導する。その結果として一部の抗腫瘍薬の代謝亢進および抗腫瘍薬の血中濃度低下を生じさせ、さらには抗腫瘍効果の減弱を引き起こす可能性がある。プロテアーゼ阻害薬は CYP3A を強力に阻害するため、抗腫瘍薬の代謝が低下し、抗腫瘍薬の血中濃度上昇および副作用増強を引き起こす。プロテアーゼ阻害薬の CYP3A 阻

#### HIV が判明する前に化学療法を行うと

##### ケース 1

2004 年 10 月左頸部の腫張に気づき近医受診。がん専門病院を紹介され、吸引針細胞診で悪性リンパ腫。骨髄生検で diffuse large B-cell lymphoma。11 月上旬に Rituximab + Full dose CHOP で治療。翌日 HIV が判明し ST 合剤による PCP の予防が開始され当院紹介。前医での CD4 は  $252\mu\text{L}$ 。Day 12 には WBC  $1000\mu\text{L}$  となり Day13 に入院したところ WBC  $800\mu\text{L}$  にて G-CSF 開始するも同日より発熱 CFPM 開始。Day20 には WBC  $18900\mu\text{L}$  と改善し解熱したため退院した。

##### ケース 2

2002 年 3 月中旬に咽頭痛あり、4 月耳鼻科で扁桃腫瘍指摘され、生検で悪性リンパ腫と診断。がん専門病院紹介され、11 月下旬同院外来で CHOP 施行。その後 HIV 陽性が判明し当院紹介。初診時(day 12)の CD4 は  $24\mu\text{L}$ 。数日前より  $39^\circ\text{C}$  の発熱を認め、WBC  $800\mu\text{L}$  まで低下していたため、入院して CFPM および GCSF 開始したところ徐々に解熱した。12 月中旬より d4T+3TC+NfV 開始。下旬より 75%EPOCH 開始。Day7 より発熱し CFPM 開始も解熱せず。Day9 に TPN を抜き、CAZ + AMK に変更したところ解熱した。1 月中旬より 2 クール目の 75%EPOCH 開始。Day6 より GCSF を併用し、発熱なく経過した。

害作用は、報告<sup>48-50)</sup>により異なるが、ritonavir (RTV) > IDV = amprenavir (APV) > nelfinavir (NFV) > saquinavir (SQV) の順序と考えられている。実際、筆者も EPOCH 療法と lopinavir/RTV を含んだ HAART を併用したところ、vincristine の血中濃度増加によると考えられる重篤な麻痺性腸閉塞を経験した<sup>51)</sup>。また CYP3A は関与しないが、indinavir を含んだ HAART 療法で cyclophosphamide のクリアランスが 1.5 倍延長したという報告もある<sup>16)</sup>。R-CHOP の 2 相試験のクライテリアでは、ZDV と RTV は併用する HAART レジメンから除外していた<sup>27)</sup>。

HIV 関連悪性リンパ腫の治療に用いられる主たる抗腫瘍薬の代謝経路を理解しておくことが重要である (表 9 参照)。また表 10 に代表的な抗 HIV 薬、表 11 に日和見感染症治療薬の ARNHL に用いられる抗腫瘍薬にたいする作用を示す。

表 9 抗腫瘍薬の代謝経路

Vincristine	主に肝ミクロソームの cytochromes P450-3A (CYP3A) で代謝される
Cyclophosphamide	主に肝ミクロソームの CYP2B6 で代謝される
Doxorubicin	細胞内に存在する NADPH 依存性の aldo-ketoreductase および microsomal glycosidase で代謝される
Etoposide	32~61% は未変化のまま尿より排泄される
Prednisone	主に肝代謝で CYP3A4 が関与する

表 10 抗 HIV 薬がエイズ関連非ホジキンリンパ腫治療薬に与える影響

	Vincristine オンコビン		Etoposide エトピシド		Cyclophosphamide エントキサン		Doxorubicin アドリアシン		Prednisolone プレドニソン	
	CYP3A4にて代謝 神経障害、血液毒性	VCR 血中濃度	グルコニル結合にて代謝、 CYPの関与なし。 血液毒性、肝障害	VP16 血中濃度	主にCYP2B6にて代謝、 CYP3A4も関与。血液毒性	CPA 血中濃度	CYPの関与なし	ADM 血中濃度	主にCYP3A4で代謝	PSL 血中濃度
Abacavir サイタシエン	○	—	○	—	○	—	○	—	○	—
Tenofovir ビラアート	○	—	○	—	○	—	○	—	○	—
Emtricitabine/ Tenofovir ジェムフア	○	—	○	—	○	—	○	—	○	—
Lamivudine エビビル	○	—	○	—	○	—	○	—	○	—
Zidovudine レトビル *1	× 血液毒性 添:併用注	—	× 血液毒性 VP16によるACETのメソキシ酸 形成の可能性がある	—	× 血液毒性	—	× 血液毒性 添:併用注	—	○	—
Stavudine ゼリット	△ 末梢神経障害	—	○	—	○	—	△ 添:linezolidにてdATの活性代謝物の生成抑制	—	○	—
Didanosine ジアデックス	△ 末梢神経障害	—	○	—	○	—	○	—	△ 肺炎・末梢神経障害 添:併用注	—
Efavirenz ストックリン	△ CYP3A4誘導	↓	○	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4誘導 神経神経症状に注意	↓
Nevirapin ビラヌーシ	△ CYP3Aの関与 添:併用注 *2	↑ ↓	○	—	△ CYP2B6で代謝	↑ ↓	○	—	△ CYP3Aの関与 添:併用注 *2	↑ ↓
Atazanavir レオタフ	△ CYP3A4阻害	↑	△ UGT1阻害、肝障害	↑	△ CYP3A4の関与	?	○	?	△ CYP3A4阻害 血糖値上昇	↑
Ritonavir ノビア	× CYP3A4阻害・添 VCRの副作用増強	↑ ↓ AUC中等度 増加・添	× VP16の副作用増強	↑ ↓ AUC中等度 増加・添	△ CYP3A4の関与	↑ ↓ 添	○	?	△ CYP3A4阻害・添 血糖値上昇	↑
Lopinavir/r カレラ	× ノビアに準ずる	↑ ↓	× ノビアに準ずる	↑ ↓	△ ノビアに準ずる	↑ ↓ 添	○ ノビアに準ずる	?	△ CYP3A4阻害・添 血糖値上昇	↑
Fosamprenavir レタソファ	△ CYP3A4阻害 添:併用禁 *3	↑	○	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4阻害 血糖値上昇	↑
Nelfinavir ビラセフト	△ CYP3A4阻害	↑	○	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4阻害・添 血糖値上昇	↑

\*1 レトビル 血液毒性のある薬剤との併用避ける

\*2 添付文書に「CYP3Aで代謝を受ける薬剤」相互に血中濃度変動の可能性について記載あり

\*3 添付文書に「治療域が狭くCYP3A4で代謝される薬剤」との記載あり

赤字:添付文書に対象となる薬品として明記されているもの

表 11 日和見感染症治療薬がエイズ関連非ホジキンリンパ腫治療薬に与える影響

	Vincristine オンコビン		Etoposide エトピシド		Cyclophosphamide エントキサン		Doxorubicin アドリアシン		Prednisolone プレドニソン	
	CYP3A4にて代謝 神経障害、血液毒性	VCR 血中濃度	グルコニル結合にて代謝 CYPの関与なし。 血液毒性、肝障害	VP16 血中濃度	主にCYP2B6にて代謝、 CYP3A4も関与。血液毒性	CPA 血中濃度	CYPの関与なし	ADM 血中濃度	主にCYP3A4で代謝	PSL 血中濃度
Ganciclovir デノン *1	× 血液毒性 添:併用注	—	× 血液毒性 添:併用注	—	× 血液毒性 添:併用注	—	× 血液毒性 添:併用注	—	○	—
Foscarnet ホスカビル	○	—	○	—	○	—	○	—	○ 電解質異常に注意	—
Clarithromycin クラリス	△ CYP3A4阻害	↑	○	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4阻害	↑
Azithromycin ジスロマック	○ 他のマクロライドのよう なCYP3A4の関与不明	—	○	—	○	—	○	—	○ 他のマクロライドのよう なCYP3A4の関与不明	—
Ethambutol エタンブトール	△ 末梢神経障害	—	○	—	○	—	○	—	△ 肺炎・末梢神経障害 添:併用注	—
Rifabutin ミコフティン	△ CYP3A4誘導	↓	○	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4誘導	↓
Fluconazole フルコナゾール	△ CYP3A4阻害	↑	○	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4阻害	↑
Voriconazole バイコント	△ CYP3A4阻害 添:併用注	↑	△ 肝障害	—	△ CYP3A4の関与	?	○	—	△ CYP3A4阻害	↑
AmphotericinB ファンキリン	○	—	○	—	○	—	○	—	△ 低K血症 添:併用注	—
AmphotericinB (Liposomal) アンビゾーム	○	—	○	—	○	—	○	—	△ 低K血症 添:併用注	—

\*1 添付文書に「骨髄抑制のある薬剤」と記載あり

赤字:添付文書に対象となる薬品として明記されているもの

## ARNHL 化学療法併用時の HAART

ARNHL の化学療法時に組み合わせる問題が少ない組み合わせとして、CYP3A の阻害作用が弱く、また AZT のような骨髄障害を生じない抗 HIV 薬が望ましい。RITV は CYP3A の阻害作用が強く、特に EPOCH 使用時には注意が必要である。表 12 の組み合わせが比較的副作用や相互作用が少ないと思われる。

ただしこれらの中には現時点での HAART の標準治療とは異なっている組み合わせもあり、ARNHL に対する化学療法終了後は適切な HAART への変更が必要である。付録 2 に抗 HIV 薬の一覧を示す。

表 12 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の化学療法と併用して問題が少ない抗 HIV 薬の組み合わせ

A. 核酸系逆転写酵素阻害薬	B. 非核酸系逆転写酵素阻害薬 あるいは プロテアーゼ阻害薬
Abacavir + lamivudine Tenofovir + emtricitabine Didanosine + lamivudine Stavudine + lamivudine	Efavirenz Fosamprenavir Nelfinavir

## 6. 日和見感染症

通常 ARNHL は CD4<200/μL で発病することが多いので、他の AIDS 指標疾患を合併している可能性も高い。また通常の HIV 感染症と異なる基準での日和見感染症予防が、化学療法を継続するために重要である（表 13 参照）。代表的な AIDS 関連日和見感染症の治療法を付録 3 に示す。また全体的な診断・治療の流れを図 6 に示す

表 12 エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療における日和見感染症の予防

日和見感染症	適応	予防法	付記
PCP	全例 CD4>200/μL でも行う	ST 合剤、ペン タミジン吸入 など	ST 合剤は高 率にアレルギー が生じる
播種性 MAC 症	CD4<100/μL で行う	アジスロマイ シン、クラリス ロマイシン	HIV 感染症の みでは CD4<50/μL
トキソプラズマ 症	トキソプラズマ IgG 抗体陽性で あれば行う	ST 合剤	ST 合剤は高 率にアレルギー が生じる
サイトメガロウ イルス症	血液疾患、移植 などと異なり CMV 血症陽性 のみでは治療し ない		骨髄障害によ り化学療法が 継続できなくな る

## 7. 評価

治療終了後の評価は CT で行う。腫瘍が残存していれば PET scan を最後の治療終了後 6-8 週して行う。

## 8. 終わりに

ARNHL の治療には NHL への経験のみならず HIV 感染症に対する理解が必要である。NHL の専門医と HIV の専門医がチームを作り対処していくことが重要である。

### 推奨のグレード

A 少なくともひとつの無作為割付試験が行われており、十分推奨できるエビデンスがある

B 少なくともひとつの良くデザインされた試験が行われているあるいは、比較研究、症例研究より得られた推奨してもよいエビデンスがある

C 専門家の報告あるいは意見、権威者の臨床経験によるエビデンスがある

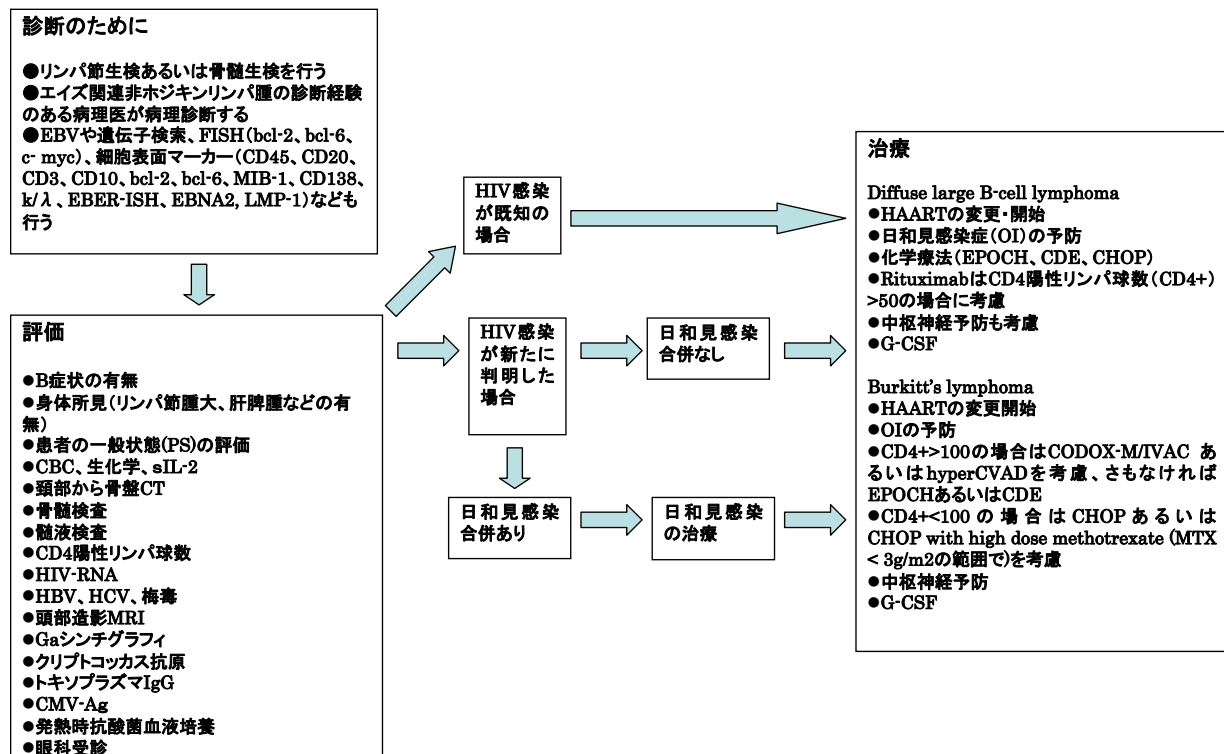


図6 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の診断・治療の流れ

## 文 献

1. Matthews GV, Bower M, Mandalia S, Powles T, Nelson MR, Gazzard BG. Changes in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma since the introduction of highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2000; 96: 2730–2734.
2. Grulich AE, Wan X, Law MG, et al. B cell stimulation and prolonged immune deficiency are risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in people with AIDS. *AIDS*. 14:133-140,2000
3. Cote TR, Biggar RF, Rosenberg PS, et al. Non-Hodgkin's lymphoma among people with AIDS: Incidence, presentation and public health burden. *Int J Cancer*. 73:645-650,1997
4. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood*. 80:8-20,1992
5. Levine AM, Seneviratne L, Espina BM, et al. Evolving characteristics of AIDS-related lymphoma. *Blood*. 96:4084-4090,2000
6. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Goedert JJ et al. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32:527–533, 2003
7. Straus DJ, Huang J, Testa MA, Levine AM, Kaplan LD. Prognostic factors in the treatment of human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: analysis of AIDS Clinical Trials Group protocol 142–low-dose versus standard-dose m-BACOD plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases. J Clin Oncol*. 1998;16:3601-3606.
8. Antinori A, Cingolani A, Alba L, et al. Better response to chemotherapy and prolonged survival in AIDS-related lymphomas responding to highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 15:1483-1491,2001
9. Sparano JA, Wiernik PH, Strack M, Leaf A, Becker N, Valentine ES. Infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in human immunodeficiency virus- and human T-cell leukemia virus type I-related non-Hodgkin's lymphoma: a highly active regimen. *J Clin Oncol*. 81:2810-2815,1993
10. Gill PS, Levine AM, Krailo M, Rarick MU, Loureiro C, Deyton L, Meyer P, Rasheed S. AIDS-related malignant lymphoma: results of prospective treatment trials. *J Clin Oncol*. 5:1322-8,1987
11. Kaplan LD, Abrams DI, Feigal E, McGrath M, Kahn J, Neville P, Ziegler J, Volberding PA. AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma in San Francisco. *JAMA*. 261:719-24,1989
12. Kaplan LD, Kahn JO, Crowe S, Northfelt D, Neville P, Grossberg H, Abrams DI, Tracey J, Mills J, Volberding PA. Clinical and virologic effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients receiving chemotherapy for human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial. *J Clin Oncol*. 9:929-40,1991
13. Levine AM, Wenz JC, Kaplan L, et al. Low dose chemotherapy with central nervous system prophylaxis and zidovudine maintenance in AIDS-related lymphoma: A prospective multi-institutional trial. *JAMA*. 266:84-88,1991
14. Kaplan LD, Straus DJ, Testa MA, et al. Low-dose compared with standard-dose m-BACOD chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma associated with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med*. 336:1641-1648,1997
15. Ratner L, Lee J, Tang S, et al. Chemotherapy for HIV associated non-Hodgkin's lymphoma in combination with highly active anti-retroviral therapy. *J Clin Oncol*. 19:2171-2178,2001
16. Vaccher E, Spina M, di Gennaro G. Concomitant cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone chemotherapy plus highly active antiretroviral therapy in patients with human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 91:155–163, 2001
17. Besson C, Goubar A, Gabarre J et al. Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood* 98:2339–2344, 2001
18. Weiss R, Mitrou P, Arasteh K et al. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma: simultaneous treatment with combined cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy and highly active antiretroviral therapy is safe and improves survival – results of the German Multicenter Trial. *Cancer* 2006; 106: 1560–1568.
19. Antinori A, Cingolani A, Alba L et al. Better response to chemotherapy and prolonged survival in AIDS-related lymphomas responding to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15: 1483–1491.
20. Navarro JT, Ribera JM, Oriol A et al. Influence of highly active anti-retroviral therapy on response to treatment and survival in patients with acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma treated with cyclophosphamide, hydroxydoxorubicin, vincristine and prednisone. *Br J Haematol* 2001; 112: 909–915.
21. Sparano JA, Lee S, Chen MG, Nazeer T, Einzig A, Ambinder RF, Henry DH, Manalo J, Li T, Von Roenn JH Phase II

Trial of Infusional Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Etoposide in Patients With HIV-Associated Non-Hodgkin's Lymphoma: An Eastern Cooperative Oncology Group Trial (E1494). *J Clin Oncol*, 22:1491-1500, 2004

22. Little RF, Pittaluga S, Grant N, Steinberg SM, Kavlick MF, Mitsuya H, Franchini G, Gutierrez M, Raffeld M, Jaffe ES, Shearer G, Yarchoan R, Wilson WH. Highly effective treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma with dose-adjusted EPOCH: impact of antiretroviral therapy suspension and tumor biology. *Blood*. 15;101:4653-9,2003

23. Spina M, Jaeger U, Sparano JA et al. Rituximab plus infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in HIV-associated non-Hodgkin lymphoma: pooled results from 3 phase 2 trials. *Blood* 2005; 105: 1891-1897. Epub 2004 Nov 18.

24. 味罾篤、柳澤如樹、菅沼明彦、今村顕史. AIDS 関連非ホジキンリンパ腫に対する HAART (d4T+3TC+NFV) を併用した dose adjusted EPOCH 療法の検討. 第21回日本エイズ学会学術集会・総会, 抄録 OS01-8, 2007, 広島

25. Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 235-242.

26. Kaplan LD, Lee JY, Ambinder RF et al. Rituximab does not improve clinical outcome in a randomized phase III trial of CHOP with or without rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma: AIDS-malignancies consortium trial 010. *Blood* 2005; 24: 1538-1543.

27. Boue F, Gabarre J, Gisselbrecht C et al. Phase II Trial of CHOP Plus Rituximab in Patients With HIV-Associated Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4123-4128. Epub 2006 Aug 8.

28. Tirelli U, Errante D, Spina M et al. Second-line chemotherapy in human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma: evidence of activity of a combination of etoposide, mitoxantrone, and prednimustine in relapsed patients. *Cancer* 1996; 77: 2127-2131.

29. Levine AM, Tulpule A, Tessman D et al. Mitoguanone therapy in patients with refractory or relapsed AIDS-related lymphoma: results from a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 1997; 15:1094-1103.

30. Spina M, Vaccher E, Juzbasic S et al. Human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin lymphoma: activity of infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide as second-line chemotherapy in 40 patients. *Cancer* 2001; 92: 200-206.

31. Bi J, Espina BM, Tulpule A, Boswell W, Levine AM. High-dose cytosine arabinoside and cisplatin regimens as salvage therapy for refractory or relapsed AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28: 416-421.

32. Yuzon R, Espina BM, Tulpule A, et al. Treatment of relapsed/refractory AIDS-related lymphoma with high dose cytarabine/cisplatin combination regimens. Program and abstracts of the XIII International AIDS Conference; July 9-14, 2000; Durban, South Africa. Abstract MoPpB1085..

33. Mark Bower, Simon Collins, Chris Cottrill, Kate Cwynarski, Silvia Montoto, Mark Nelson, Nneka Nwokolo, Tom Powles, Justin Stebbing, Nick Wales, Andy Webb.. BHIVA guidelines: HIV associated malignancies (2008). <http://www.bhiva.org/cms1221367.asp>

34. National Cancer Institute, AIDS-Related Lymphoma Treatment. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/AIDS-related-lymphoma/healthprofessional>

35. Krishnan A, Molina A, Zaia J et al. Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas. *Blood* 2005; 105: 874-878. Epub 2004 Sep 23.

36. Gabarre J, Marcelin AG, Azar N et al. High-dose therapy plus autologous hematopoietic stem cell transplantation for human immunodeficiency virus (HIV)-related lymphoma: results and impact on HIV disease. *Haematologica* 2004; 89: 1100-1108.

37. Re A, Cattaneo C, Michieli M et al. High-dose therapy and autologous peripheral-blood stem-cell transplantation as salvage treatment for HIV-associated lymphoma in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4423-4427. Epub 2003 Oct 27. study 020. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 59-66.

38. Wang ES, Straus DJ, Teruya-Feldstein J et al. Intensive chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, high-dose methotrexate/ifosfamide, etoposide, and high-dose cytarabine (CODOX-M/IVAC) for human immunodeficiency virus-associated Burkitt lymphoma. *Cancer* 2003; 98: 1196-1205.

39. Cortes J, Thomas D, Rios A et al. Hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone and highly active antiretroviral therapy for patients with acquired immunodeficiency syndrome-related Burkitt lymphoma/leukemia. *Cancer* 2002; 94: 1492-1499.

40. Dunleavy K, Pittaluga S, Janik J, et al. Novel Treatment of Burkitt Lymphoma with Dose-Adjusted EPOCH-Rituximab: Preliminary Results Showing Excellent Outcome. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 108: Abstract 2736

41. Komanduri KV, Luce JA, McGrath MS et al. The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;13:215–226.
42. Chadburn A, Hyjek E, Mathew S et al. KSHV-positive solid lymphomas represent an extra-cavitary variant of primary effusion lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1401–1416.
43. Colomo L, Loong F, Rives S. Plasmablastic lymphomas (PBL): diverse lymphomas associated with immuno-deficiency and HIV. 8th International Conference on Malignancies in AIDS and Other Immunodeficiencies 2004, abstract 41.
44. Chetty R, Hlatwayo N, Muc R et al. Plasmablastic lymphoma in HIV+ patients: an expanding spectrum. *Histopathology* 2003;42:605–609.
45. Schichman SA, McClure R, Schaefer RF et al. HIV and plasmablastic lymphoma manifesting in sinus, testicles, and bones: a further expansion of the disease spectrum. *Am J Hematol* 2004;77:291–295.
46. Hoffmann C, Wolf E, Faetkenheuer G. Response to highly active antiretroviral therapy strongly predicts outcome in patients with AIDS-related lymphoma. *AIDS* 17:1521–1529, 2003
47. Gill PS, Rarick MU, Brynes RL, Causey D, Levine AM. Azidothymidine and bone marrow failure in AIDS. *Ann Intern Med*. 107:502-505, 1987
48. Lillibridge JH, Liang BH, Kerr BM, Webber S, Quart B, Shetty BV, Lee CA. Characterization of the selectivity and mechanism of human cytochrome P450 inhibition by the human immunodeficiency virus-protease inhibitor nelfinavir mesylate. *Drug Metab Dispos*. 26:609-16, 1998
49. von Moltke LL, Greenblatt DJ, Grassi JM, Granda BW, Duan SX, Fogelman SM, Daily JP, Hamatz JS, Shader RI. Protease inhibitors as inhibitors of human cytochromes P450: high risk associated with ritonavir. *J Clin Pharmacol*. 38:106-11, 1998
50. Williams GC, Sinko PJ. Oral absorption of the HIV protease inhibitors: a current update. *Adv Drug Deliv Rev*. 39:211-238, 1999
51. 岡 慎一、味澤 篤。第16回日本エイズ学会シンポジウム記録 臨床医学 Selected Papers。日本エイズ学会誌 5:118–125, 2003



## 付録 1

### AIDS 関連非ホジキンリンパ腫に対する HAART (d4T+3TC+NfV) を併用した dose adjusted EPOCH 療法の検討

味澤 篤、柳沢如樹、菅沼明彦、今村顕史

東京都立駒込病院感染症科

第 21 回日本エイズ学会学術集会・総会、抄録 OS01-8, 2007, 広島

#### 抄 録

AIDS 関連非ホジキンリンパ腫 (ARNHL) の予後は非 HIV 感染者の非ホジキンリンパ腫 (NHL) に比較して不良である。その原因としては HIV 感染症を基盤とした日和見感染症の合併、潜在的な骨髄障害による高度な副作用などが考えられている。また現在非 HIV 感染者における NHL の標準的治療は rituximab-CHOP であるが、ARNHL に対する有効性は CHOP と変わらない。したがって ARNHL に対する標準治療はその簡便性から CHOP であるが、dose adjusted (DA) EPOCH の評価も高い。しかし DA EPOCH では、薬物相互作用による副作用予防のために、化学療法中は HAART を中断することになっており HAART 中断による問題点も多い。そこで今回われわれは ARNHL に対して d4T+3TC+NfV を併用した dose adjusted EPOCH 療法を試みたのでその結果を報告する。【対象と方法】2001 年から 2006 年に当院を受診した ARNHL の患者で、診療録を用いてレトロスペクティブに検討を行った。プロトコールを図 1 に示す。【結果】症例は 11 例で全例男性であった。ARNHL 発症時の年齢は中央値 44 歳 (31-63 歳)、CD4 リンパ球数は  $62/\mu\text{L}$  (16-320)、HIV-RNA は 230000 copies/ml (830-2500000)、LDH は 201 (128-1882) であった。組織形は diffuse large B-cell が 10 例、Burkitt が 1 例であった。病期は stage I・2 が各 2 例、3 が 3 例、4 が 4 例。治療成績は CR 5 例、PR 4 例、PD 2 例であるが PR 4 例も生存していた。生存期間 (図 2) は中央値 36 ヶ月 (2-78)。CD4 数別にみると (表 1)、 $100/\mu\text{L}$  未満群は病期に差はないが、IPI スコ

アは高く、投与量減量にもかかわらず好中球は早期に減少した。死亡した 2 例は  $\text{CD4} < 100/\mu\text{L}$  であった。その他、便秘が高頻度に見られた。【結論】HAART を併用した DA EPOCH 療法は ARNHL に対して有効な治療法である。

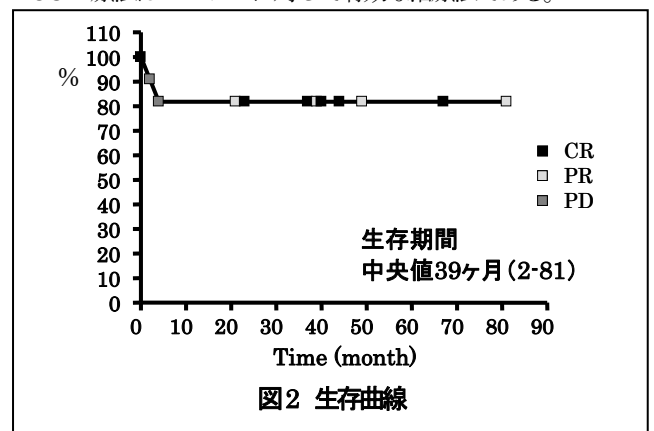


表 1 CD4 陽性リンパ球数による臨床像の違い

		CD4 陽性リンパ球	
		>100/ $\mu\text{L}$	<100/ $\mu\text{L}$
N		4	7
死亡例		0	2
病期	Stage I II	1	2
	Stage III IV	3	5
IPI スコア (例)	0-1	3	2
	2	-	3
	3	1	1*
	4-5	-	1*
1 クール目の投与量	100%	2	1
	75%	2	2
	60%	-	2
	50%	-	2
好中球減少	Grade I	1	-
	Grade II	-	-
	Grade III	1	2
	Grade IV	2	5
好中球減少までの平均日数		13	10
便秘 (例)	あり	4#	4
	なし	0	3

\*; 死亡例 #; 1例はイレウス

day	1	2	3	4	5
Etoposide 50mg/m <sup>2</sup> /day 24hr 持続静注	4日間				
Vincristine 0.4mg/m <sup>2</sup> /day 24hr 持続静注	4日間				
Doxorubicin 10mg/m <sup>2</sup> /day 24hr 持続静注	4日間				
Cyclophosphamide 点滴静注					↓
CD4 < 100/mm <sup>3</sup> では 187mg/m <sup>2</sup>					
CD4 ≥ 100/mm <sup>3</sup> では 375mg/m <sup>2</sup>					
Prednisone 60mg/m <sup>2</sup> 経口	↓	↓	↓	↓	↓

・ARNHL と診断し、他に日和見感染がなければ直ちに d4T+3TC+NfV を開始する  
 ・CD4 が低値かつ IPI スコアが高い場合は G-CSF を day 6 より通常量で開始する。それ以外では通常量を適宜使用する  
 ・Cyclophosphamide の投与量は、2 クール目以後も直近の CD4 値で決定する  
 ・Prednisone 以外の投与量は、CD4、年齢を考慮しながら適宜調整する

図 1 HAART 併用 EPOCH 療法のレジメ

# 付録2 抗HIV薬一覧

## 核酸系逆転写酵素阻害薬一覧










商品名	一般名	略名		含有量	用法・用量	食事の影響	生物学的利用率	血清中半減期	細胞内半減期	P-450への影響	備考
レトロビル	ジドブジン	ZDV AZT		100mg	500～600mgを2～6回に分けて投与	なし	60%	1.1h	3h	なし	CrCl<20ml/min:300-400mg/day、血液透析患者:重篤な肝機能障害:300mg/day
ゼラット	サニルブジン	d4T		15mg 20mg	80mg/分2(体重60Kg未満の場合60mg/分2)	なし	86%	1.0h	3.5h	なし	体重60Kg以上:CrCl>50ml/min:40mgを1日2回、26-50ml/min:40mgを1日1回、10-25ml/min:20mgを1日1回、血液透析患者:透析後に20mgを1日1回 体重60Kg未満:CrCl>50ml/min:30mgを1日2回、26-50ml/min:30mgを1日1回、10-25ml/min:15mgを1日1回、血液透析患者:透析後に15mgを1日1回
エビビル	ラミブジン	3TC		150mg 300mg	300mg/分1または300mg/分2	なし	86%	3-6h	12h	なし	CrCl≥50ml/min:150mgを1日2回、30-49ml/min:150mgを1日1回、15-29ml/min:初回150mgその後100mgを1日1回、5-14ml/min:初回150mgその後50mgを1日1回、<5ml/min:初回50mgその後25mgを1日1回
エムトリバ	エムトリシタビン	FTC		200mg	200mg/分1	なし	92%	10h	>20h	なし	CrCl≥50ml/min:200mg/分1、30-49ml/min:200mgを2日に1回、15-29ml/min:200mgを3日に1回、<15ml/min:200mgを4日に1回、血液透析患者:200mgを4日に1回、透析日に投与する場合は透析後投与
ヴァイデックス EC	ジダノシン	ddI		125mg 200mg	400mg/分1(体重60Kg未満の場合250mg/分1)	食間	30-40%	1.6h	25-40h	なし	体重60Kg以上(1日投与量):CrCl≥50ml/min:400mg、30-49ml/min:200mg、10-29ml/min:125mg、<10ml/min:125mg 体重60Kg未満(1日投与量):CrCl≥50ml/min:250mg、30-49ml/min:125mg、10-29ml/min:125mg、<10ml/min:避けること
ハイビッド	ザルシタビン	ddC		0.375mg	2.25mg/分3	なし	85%	1.2h	3h	なし	CrCl>50ml/min:2.25mg/分3、10-50ml/min:1.5mg/分2、<10ml/min:0.75mg/分1
ザイアジェン	アバカビル	ABC		300mg	600mg/分1または600mg/分2	なし	83%	1.5h	3.3h	なし	
コンビル	ジドブジン +ラミブジン	COM		ZDV 300mg 3TC 150mg	2錠/分2	なし	—	—	—	なし	
エプソコム	アバカビル +ラミブジン	EZC		ABC 600mg 3TC 300mg	1錠/分1	なし	—	—	—	なし	
ビリアード	アマルブテノビル +ジシプロキシル	TDF		300mg	300mg/分1	なし	空腹時25% 高脂肪食摂取時39%	17h	10-50h	なし	CrCl>50ml/min:300mg/分1、30-49ml/min:300mg/分1を2日に1回、10-29ml/min:300mg/分1を1週間に2回、血液透析患者:分1を1週間に1回又は累積約12時間の透析終了後に本剤300mgを投与(<10ml/minで透析を行っていない患者における検討はされていない)
ツルバタ	アマルブテノビル +エムトリシタビン	TVD		TDF 300mg FTC 200mg	1錠/分1	なし	—	—	—	なし	CrCl≥50ml/min:1錠/分1、30-49ml/min:1錠を2日に1回、<30ml/min:TDF/FTC製剤により個別に用法用量の調節を行う



# 非核酸系逆転写酵素阻害薬一覧

商品名	一般名	略名		含有量	用法・用量	食事の影響	生物学的 利用率	血清中半減期	細胞内半減期	P-450への 影響	備考
ビラミューン	ネビラピン	NVP		200mg	400mg/分2	なし	>90%	20-30h	—	誘導: CYP3 A4	
ヌシクシオシド	エファアレンゾ	EFV		200mg	600mg/分1	なし	No Data	40-55h	—	誘導: CYP3 A4 阻害: CYP2 C9・2C19- 3A4	高脂肪食摂取後、本剤1200mgを単回投与したとき、bioavailabilityは50%上昇。
レスクリブター	メシル酸 デラビルジン	DLV		200mg	1200mg/分3	なし	85%	5.8h	—	阻害: CYP2 C9・2C19- 3A4	高脂肪食後の服用でAUCは26%低下。制酸剤との併用でAUCは48%低下。

# プロテアーゼ阻害薬一覧

商品名	一般名	略名		含有量	用法・用量	食事の影響	生物学的 利用率	血清中半減期	代謝・排泄	P-450への 影響	備考
クリキシバン	硫酸インジナビル	IDV		200mg	2400mg/分3	食前	65%	1.5-2h	糞中:83±1% 尿中:19±3%	阻害: CYP3 A4	食事摂取後の800mg単回投与では空腹時と比較Cmaxが43%、AUCが24%減少 <sup>3)</sup> 。
インビラーゼ カブセル錠	メシル酸サキナ ビル	SQV		200mg 500mg	SQV2000mg+ RTV200mg/分2	食後	4%(SQV 単剤使用時)	1-2h	糞中:88% 尿中:1%	阻害: CYP3 A4	
ノービア ・ソフトカプセル	リトナビル	RTV		100mg	1200mg/分2	食後	No Data	3-5h	糞中:86.4% 尿中:11.3%	阻害: CYP3A 4・2C9・2C1 9・2D6(CYP 3A4に対する 影響は強力)	空腹時と食後投与との比較ではCmax、AUCとも両群間に統計的な有意差は認められていないが、副作用を軽減するため、食後の服薬が望ましい。
ビラセプト	メシル酸 ネルフィナビル	NFV		250mg	2500mg/分2 2250mg/分3	食後	20-80%	3.5-5h	糞中:78.2% 尿中:1.6%	阻害: CYP3 A4	500mg空腹単回投与結果を食後単回投与と比較Cmax51%に減少、AUC41%に減少
レクシバ	ホスアンブレナ ビルカルシウム 水和物	FPV		700mg	FPV1400mg+ RTV200mg/分2* FPV1400mg+ RTV200mg/分1 FPV2800mg/分2	なし	No Data	7.7h(APV)	糞中:75% 尿中:14.3% (APV)	阻害: CYP3 A4・2C19- 2E1 (APV)	*PIの投与経験がある患者は FPV1400mg+RTV200mg/分2のみ追加 軽度又は中等度の肝機能障害患者 (Child-Pugh分類の合計点数:5~8)に対し、リトナビルを併用せずに本剤を投与する場合 には、ホスアンブレナビルとして1400mg/分2に減量し、注意して投与すること。
カレトラ錠	ロビナビル/ リトナビル	LPV/ RTV		200mg/ 50mg	4錠/分2	なし	No Data	5-6h	糞中:83% 尿中:10%	阻害: CYP3 A4 (LPV)	本剤の単回投与における薬物動態を食後投与(高脂肪食、872kcal、56%が脂肪由来)と空腹時投与とで比較したところ、CmaxおよびAUCで有意差は認められなかった。
レイアタッツ	硫酸アタザナビル	ATV		150mg 200mg	2Cap/分1	食中 食直後	No Data	7h	糞中:79% 尿中:13%	阻害: CYP3 A4	高脂肪食でAUCは35%増加 軽度~中等度の肝障害のある患者には、慎重投与。中等度の肝障害患者 (Child-Pugh分類B)には、本剤の投与量を300mg/分1に減量を考慮。重度の肝障害患者 (Child-Pugh分類C)には本剤を投与しない。
アジスタ	ダルナビル	DRV		300mg +RTV200mg /分2	DRV1200mg	食中 食直後	DRV600 mg: 37% DRV600mg +RTV100 mg: 82%	15h	糞中:79.5% 尿中:13.93%	阻害: CYP3A4	DRV/RTV:400/100mgを食事と共に投与したときのDRVのCmax及びAUCは、空腹時投与と比較して約30%増加。検討した食事の範囲内(総カロリーは240~928kcal)では、食事の内容によるDRVのCmax及びAUCに差はみられなかった。

## 付録3

### エイズ関連日和見感染の診断と治療

味澤 篤

東京都立駒込病院感染症科

#### 1. ニューモシスティス肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*)

AIDS で最もよく見られる日和見感染症である。症状としては、乾性咳嗽、労作時息切れおよび発熱などが認められる。胸部X線ですりガラス陰影、血液ガスでAaDO<sub>2</sub>の開大、胸部CTで地図状の濃度上昇あるいはGaシンチグラフィーで両側肺への異常集積が見られる。確定診断は、気管支洗浄液での *Pneumocystis jiroveci* (PJ) の証明および喀痰 PJ-PCR の証明などである。

標準的治療

- (1) トリメトプリム/スルファメトキサゾール  
5mg/kg(トリメトプリム換算で)、8時間毎、少なくとも21日間
- (2) ペンタミジン  
3-4mg/kg/日、24時間毎点滴静注、少なくとも21日間

#### 2. トキソプラズマ症

AIDS で最もよく見られる中枢神経系の日和見感染症の一つである。発症部位は脳で、まれに肺、網膜、心臓、脾臓、肝臓、腸、精巣にみられる。局所神経症状(片麻痺、失語など)、頭痛、発熱、意識障害が認められる。頭部CTあるいはMRIで、リング状あるいは結節状の造影所見を認める。しかしトキソプラズマ脳炎の多くは脳原発悪性リンパ腫との鑑別が困難であるので、トキソプラズマ脳炎が疑わしい場合は2週間の治療的診断をまず試みる。

標準的治療

- (1) Pyrimethamine 50mg(loadingは100mgで) + sulfadiazine 4g + ロイコボリン10mg
  - (2) Pyrimethamine 50mg(loadingは100mgで) + クリンダマイシン600mg6時間毎 + ロイコボリン10mg
- Pyrimethamineにより白血球や血小板減少が起きるので予防的にロイコボリンを経口的に10mg/日投与する。

#### 3. マイコバクテリウム・アビウム・コンプレックス (MAC) 症

AIDS では全身性あるいは肺外の病変が多く、肺病変も典型的なものは少ない。

発熱、食欲低下、喀痰・咳嗽、腹痛、夜間盗汗および全身衰弱がみられる。確定診断は血液、喀痰、骨髓、消化管病変生検部などからの菌検出であるが、陰性のことも多い。CD4が低値の症例で原因不明の発熱が継続する場合には治療的診断を行う。HAARTを行うことによって、免疫再構築症候群を生じることも多い。特にCD4<50個/μL未滿の場合は、より重篤になりやすい。発熱、体重減少、白血球増加および血液培養MAC陽性が生じる。治療は、HAARTの継続、抗MAC療法、鎮痛解熱薬、副腎皮質ステロイドホルモン(より重篤な場合のみ)の投与など。

標準的治療

- (1) クラリスロマイシン 800mg/日またはアジスロマイシン600mg/日 + エサンブトール750mg/日 ± リファブチン300mg/日(代替はシプロキサシまたはレボフロキサシンあるいはアミカシン)

#### 4. サイトメガロウイルス感染症

サイトメガロウイルス(CMV)は、AIDSでは網膜炎、消化管感染、中枢神経感染がよくみられ、移植の場合と異なり肺炎および肝炎はまれ。網膜炎では円錐状、霧視などではじまり、進行すると失明する。消化管感染では食道、胃、小腸、大腸にびらんや潰瘍形成が生じ疼痛、出血および穿孔が生じる。病変部からのCMVの分離、抗原検出、病理組織により診断される。血中CMV抗原もスクリーニング検査として有用である。

標準的治療

- (1) ガンシクロビル 5mg/kg点滴静注12時間毎
- 副作用としては好中球減少や血小板減少が高頻度でみられる

- (2) ホスカビル静注
- (3) バルガンシクロビル経口 (CMV 網膜炎の導入治療に有効な経口薬である。有効性はガンシクロビルと同等)

## 5. カンジダ症

AIDS で最も多く見られる真菌症である。口腔および食道カンジダ症がほとんどで深在性はまれ。口腔カンジダ症では、肉眼所見および鏡検で診断する。食道カンジダ症では内視鏡所見および病理学的所見で診断する。

標準的治療

口腔カンジダ症

- (1) クロトリマゾールトローチ
- (2) フルコナゾール(FCZ) 100mg/日

食道カンジダ症

- (1) FCZ 200mg/日

## 6. クリプトコッカス症

AIDS では髄膜炎を生じることが多いが、無症候性に肺感染を生じることもある。髄膜炎では頭痛、発熱、全身倦怠感が主で、髄膜刺激症状に乏しい。スクリーニング検査として血清クリプトコッカス抗原が有用である。髄膜炎では髄液検査が有用であるが、髄液所見は通常の真菌性髄膜炎としては非典型的で細胞数増加や蛋白増加が見られないことが多く、髄液の塗抹染色、培養、および抗原検査が重要である。

標準的治療

髄膜炎導入治療(2W まで)

- (1) アムホテリシンB 0.7mg/kg/日あるいはリポソーマルアムホテリシンB 6mg/kg/日+5-Flucytosine 100 mg/kg/日 (リポソーマルは5FCの毒性が出やすいので注意)
- (2) アムホテリシンB 0.7mg/kg/日
- (3) FCZ 400-800mg/日

導入治療後 10W までの治療

- (1) FCZ 400mg/日
- (2) アムホテリシンB 0.7mg/kg/日

## 7. クリプトスポリジウム症

AIDS 患者では、慢性の重篤な胃腸炎を呈し死に至ることもある。クリプトスポリジウムは乾燥や60度以上の高熱に弱いが、病院内で通常使われている消毒薬では死滅しない。糞便汚染された飲食物や手指を介して感染が生じる。食道から直腸までの消化管に感染し、時には胆道あるいは肺臓にも感染する。水様下痢、腹痛、体重減少、食欲不

振、鼓腸および倦怠感が認められる。ショ糖浮遊液法による便の鏡検で見つかる場合もあるが、抗酸菌染色を行うとオオシストを見つけやすくなる。小腸生検によって診断される場合もある。

標準的治療

- (1) HAART

## 8. カポジ肉腫

HIV による免疫不全に加えてヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8) が関与して生じると考えられている悪性腫瘍。顔面、四肢、口腔内、内臓などさまざまな部位にみられる。皮疹、皮膚腫瘍、浮腫および疼痛を認める。内臓病変特に肺のカポジ肉腫で進行した場合に呼吸困難、胸水および咯血を認める。生検により診断される。悪性リンパ腫としばしば合併するので注意が必要である。

標準的治療

- (1) HAART
- (2) 放射線療法
- (3) 抗腫瘍薬

Liposomal doxorubicin

ABV(adriamycin, bleomycin and vincristine or vinblastine)

HAART のみでも 60%はコントロール可能である。効果不十分の場合は抗癌剤、放射線療法などをもちいる。皮膚のみの場合は美容上の問題がなければ経過観察する場合が多い。内臓病変でも消化管の場合は HAART のみで改善することが多い。肺カポジ肉腫の場合は急速に呼吸不全に進行することがあり、HAART に加えて抗腫瘍薬が必要となる。Liposomal doxorubicin は ABV 療法に比べ特に副作用が少ない点で優れている。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
永井宏和	ホジキンリンパ腫	中川和彦	Cancer Treatment Navigator	メディカルビュー社	東京	2008	206-207
藤原成悦	動物モデル	清水則夫 柳井秀雄	EBウイルス	診断と治療社	東京	2008	88-92
照井康仁 畠清彦	4 6 造血器腫瘍第V部 がんの分子標的治療薬のトランスレーショナルリサーチ	鶴尾隆	がんの分子標的治療	南山堂	東京	2008	387-391
照井康仁	ibritumomab tiuxetan (90Y標識マウス型 CD20mb)	有吉寛	エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2009	メディカルレビュー社	東京	2008	512-514
照井康仁	IV-3 血液疾患の研究- トランスレーショナルリサーチ-	畠清彦	腫瘍内科オリエンテーション	医薬ジャーナル	東京	2008	140-147
岡田誠治	フローサイトメトリーのための抗体の標識と細胞の染色.	高津聖志 三宅健介 山元 弘 瀧 伸介	抗体実験マニュアル 改訂版	羊土社	東京	2008	122-137

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Nagai H</u> , Iwasaki N, Odawara T, <u>Okada S</u> .	Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan.	<b>Int J Hematol.</b>	87巻 4号	442-443	2008
<u>Nagai H</u> , Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Hanada S, Kawano F, Sunami K, Inoue N, Sawamura M, Nishiura T, Hotta T, Horibe H.	Remission induction therapy containing rituximab markedly improved the outcome of untreated mature B cell lymphoma.	<b>British J Haematol.</b>	143巻 5号	672-680	2008

Kubota T, Moritani S, Yoshino T, <u>Nagai H</u> , Terasaki H	Ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with polyclonal hypergammaglobulinemia.	<i>Am J Ophthalmol.</i>	145卷 6号	1002-1006,	2008
Terasawa T, Lau J, Bardet S, Couturier O, Hotta T, Hutchings M, Nihashi T, <u>Nagai H</u> .	Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Interim Response Assessment of Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Systematic Review.	<i>J Clin Oncol.</i>	印刷 中		2009
Ennishi D, <u>Terui Y</u> , Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K.	Increased incidence of interstitial pneumonia by CHOP combines with rituximab.	<i>Int J Hematol</i>	87卷 4号	393-7	2008
Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, Asai H, Mishima Y, <u>Terui Y</u> , Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Yamaguchi M, Suzuki R, Tanimoto M, Hatake K.	CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy.	<i>Ann Oncol</i>	19卷 11号	1921-6	2008
Mishima Y, <u>Terui Y</u> , Mishima Y, Taniyama A, Kuniyoshi R, Takizawa T, Kimura S, Ozawa K, Hatake K.	Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors.	<i>Cancer Sci.</i>	印刷 中		2008
Ennishi D, Yokoyama M, <u>Terui Y</u> , Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K.	Does rituximab really induce hepatitis C virus reactivation?	<i>J Clin Oncol</i>	26卷 28号	4695-6	2008

Ennishi D, Yokoyama M, <u>Terui Y</u> , Asai H, Sakajiri S, Mishima Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Takeuchi K, Tanimoto M, Hatake K.	Soluble interleukin-2 receptor retains prognostic value in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP (RCHOP) therapy.	<i>Ann Oncol</i>	20卷 3号	526-533	2008
<u>erui Y</u> ,Mishima Y,Sugimura N,Kojima K,Sakurai T,Mishima Y, Kuniyoshi R,Taniyama A,Yokoyama M, Sakajiri S,Takeuchi K,Watanabe C, Takahashi S,Ito Y,Hatake K.	Identification of CD20 C- Terminal Deletion Mutations Associated With Loss of CD20 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma.	<i>Clin Cancer Res.</i>	印刷 中		2009
Mishima Y, Sugimura N, Matsumoto- Mishima Y, <u>Terui Y</u> , Takeuchi K, Asai S, Ennishi D, Asai H, Yokoyama M, Kojima K, Hatake K.	An imaging-based rapid evaluation method for complement-dependent cytotoxicity discriminated clinical response to rituximab-containing chemotherapy.	<i>Clin Cancer Res.</i>	印刷 中		2009
Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, <u>Watanabe T</u> , Horie R.	Induction of apoptosis in Epstein- Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ.	<i>Microbes Infect</i>	10卷 7号	748-756	2008
Suzuki K, Juelich T, Lim H, Ishida T, <u>Watanabe T</u> , Cooper DA, Rao S, Kelleher AD.	Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region.	<i>J Biol Chem</i>	283卷 34号	23353- 23363	2008



Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, <u>Watanabe T.</u>	Identification of the Rela domain responsible for action of a new NFkappaB inhibitor DHMEQ	<b>Biochem Biophys Res Commun</b>	376卷 2号	310-314	2008
Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, <u>Watanabe T.</u>	Transient inhibition of NF-kB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation	<b>Cancer Sci</b>	印刷 中		2009
Yamagishi M, Ishida T, Miyake A, Cooper DA, Kelleher AD, Suzuki K, <u>Watanabe T.</u>	Retroviral delivery of Promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription	<b>Microbes Infect</b>	印刷 中		2009
Dewan, MZ, Takamatsu, N, Hidaka, T, Hatakeyama, K, Nakahata, S, Fujisawa, J, <u>Katano, H.</u> Yamamoto, N, Morishita, K.	Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. J Virol.	<b>J. Virol.</b>	82卷 23号	11958- 11963	2008
Dewan, MZ, Tomita, M, <u>Katano, H.</u> Yamamoto, N, Ahmed, S, Yamamoto, M, Sata, T, Mori, N, Yamamoto, N.	An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells.	<b>Int J Cancer.</b>	124卷 3号	622-629	2009
Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase	<b>J Med Chem</b>	.印刷 中		2009
Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis.	<b>Cancer Sci.</b>	印刷 中.		2009

Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells.	<b><i>FEBS Let.</i></b>	582卷 29号	4053-8	2008
Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirion production.	<b><i>J Gen Virol.</i></b>	89 卷 (Pt12)	3144-9	2008
Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, <u>Komano J.</u>	Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription.	<b><i>AIDS.</i></b>	22卷 9号	1081-3	2008
Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, <u>Komano J.</u> , Tanaka Y, Koyanagi Y.	A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane.	<b><i>Traffic.</i></b>	9卷 4号	540-58	2008
Imadome K, <u>Shimizu N.</u> , Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and <u>Fujiwara S.</u>	CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells.	<b><i>Microbes and Infection</i></b>	印刷 中		2009
Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., <u>Shimizu, N.</u> , Imadome, K., Yajima, M., and <u>Fujiwara, S.</u>	The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- $\kappa$ B.	<b><i>Virus Research</i></b>	131卷 2号	170-179	2008

Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., <u>Shimizu, N.</u> , Honda, M., Yamamoto, N., and <u>Fujiwara, S.</u>	A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses.	<i>Journal of Infectious Diseases</i>	198卷 5号	673-682	2008
Takahashi H, Sugita S, <u>Shimizu N</u> , Mochizuki M.	A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis.	<i>Japanese Journal of Ophthalmology</i>	52卷 2号	136-138	2008
Sugita S, <u>Shimizu N</u> , Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M.	Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. , 92(7):928-932, 2008.	<i>British Journal of Ophthalmology</i>	92卷 7号	928-932	2008
Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, <u>Shimizu N</u> , Morio T and Mochizuki M.	Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpete.	<i>British Journal of Ophthalmology</i>	92卷 4号	505-508	2008
Kanno H, Watabe D, <u>Shimizu N</u> , Sawai T.	Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines.	<i>Clinical Experimental Immunology</i>	151卷 3号	519-527	2008
<u>Okada S</u> , Harada H, Ito T, Saito T, and Suzu S.	Development of human hematopoietic and acquired immune system in NOD/Scid/Jak3 <sup>null</sup> mice engrafted with cord blood-derived human hematopoietic stem cells.	<i>Int J Hematol</i>	88卷 5号	476-482	2008
Murakami T, Harada H, Suico MA, Shuto T Suzu S, Kai H, and <u>Okada S</u>	Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine <i>Mao-to</i> , efficiently activates the replication of latent HIV-1 in a monocytic cell line.	<i>Biol Pharm Bull</i>	31卷 12号	2334-2337	2008
Wang X, Xiao G, Zhang Y, Gao X, <u>Okada S</u> , and Liu X	Regulation of <i>Tcrb</i> recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition.	<i>Nature Immunol</i>	9卷 7号	794-801	2008

<u>照井康仁</u>	抗CD22抗体の基礎と臨床 がん分子標的治療の最先端	医学のあゆみ	224巻1号	27-31	2008
畠清彦、 横山雅大、 <u>照井康仁</u>	CD20抗体、CD52抗体 抗体エンジニアリングと抗体医薬	Medical Science Digest	34巻5号	26-28	2008
<u>照井康仁</u>	限局期アグレッシブリンパ腫に対する放射線照射の意義	血液・腫瘍科	57巻1号	21-24	2008
<u>照井康仁</u>	悪性リンパ腫に対する化学療法ー臨床医に求められる基礎知識 悪性リンパ腫と闘う：治癒を目指すために必要な治療手段	内科	102巻2号	271-274	2008
鈴伸也、 <u>岡田誠治</u>	Srcキナーゼの新たな役割ーゴルジ体を通して.	血液・腫瘍科	57巻3号	326-329	2008
<u>永井宏和</u>	ホジキンリンパ腫 がん薬物療法学ー基礎・臨床研究のアップデートー	日本臨床	67巻増刊号	764-770	2009
<u>永井宏和</u>	再発または難治性多発性骨髄腫におけるレナリドマイドの役割	医薬ジャーナル	44巻7号	113-118	2008
<u>永井宏和</u>	濾胞性リンパ腫ー悪性リンパ腫 update in 2008	内科	102巻2号	293-299,	2008
<u>岡田誠治、</u> <u>永井宏和、</u> <u>味沢篤</u>	エイズ関連リンパ腫の現状と治療戦略	臨床血液	49巻10号	206-214	2008